

SÉRIE A, N° 2288

N° D'ORDRE :

3159

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

JACQUES POLONOVSKI

1^{re} THÈSE. — ACTION DES AMINES QUATERNAIRES A CHAÎNE GRASSE
SUR LES PROTÉINES, LES LIPIDES ET LES GÉNAPSES
LIPOPROTÉIQUES.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 10 mai 1949 devant la Commission d'examen.

MM. G. DUPONT..... *Président.*

E. AUBEL..... }
L. BAUER..... } *Examineurs*

PARIS

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS

LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN

1950



FACULTÉ DES SCIENCES

Nom du Candidat : **POLONOVSKI.**

Prénoms : **Jacques, Louis, Max.**

Date de la soutenance : 10 mai 1949.

Série A, n° 2288. Numéro d'ordre : 3159.

POLONOVSKI (Jacques). — Action des amines quaternaires à chaîne grasse sur les protéines, les lipides et les cénapses lipoprotéiques. *Paris, Masson, 1950. In-8°, 100 p., 25 fig.*

Th. Sc. Phys. Paris, 1949. Sér. A, 2288. N° 3159.

POLONOVSKI (Jacques). — Action des amines quaternaires à chaîne grasse sur les protéines, les lipides et les cénapses lipoprotéiques. *Paris, Masson, 1950. In-8°, 100 p., 25 fig.*

Th. Sc. Phys. Paris, 1949. Sér. A, 2288. N° 3159.

POLONOVSKI (Jacques). — Action des amines quaternaires à chaîne grasse sur les protéines, les lipides et les cénapses lipoprotéiques. *Paris, Masson, 1950. In-8°, 100 p., 25 fig.*

Th. Sc. Phys. Paris, 1949. Sér. A, 2288. N° 3159.

POLONOVSKI (Jacques). — Action des amines quaternaires à chaîne grasse sur les protéines, les lipides et les cénapses lipoprotéiques. *Paris, Masson, 1950. In-8°, 100 p., 25 fig.*

Th. Sc. Phys. Paris, 1949. Sér. A, 2288. N° 3159.

SÉRIE A, N° 2288

N° D'ORDRE :

3159

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

JACQUES POLONOVSKI

1^{re} THÈSE. — ACTION DES AMINES QUATERNAIRES A CHAÎNE GRASSE
SUR LES PROTÉINES, LES LIPIDES ET LES CÉNAPSES
LIPOPROTÉIQUES.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 10 mai 1949 devant la Commission d'examen.

MM. G. DUPONT..... *Président.*

E. AUBEL.....
L. BAUER..... } *Examineurs.*

PARIS

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS

LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN

—
1950

Doyen..... M. A. CHATELET.

PROFESSEURS

L. BLARINGHEM ..	T Botanique.	CHAUDRON.....	T Chimie appliquée.
G. JULIA	T Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	WYART.....	Minéralogie.
A. DENJOY	T Théorie des fonctions, et Topologie.	TEISSIER.....	T Zoologie.
L. LUTAUD.....	T Géographie physique et Géologie dynamique.	MANGENOT.....	T Biologie végétale.
E. DARMOIS.....	T Enseignement de Physique.	P. AUGER.....	T Physique quantique et relativité.
Robert LÉVY.....	T Physiologie comparée.	MONNIER.....	Physiologie générale.
Henri VILLAT.....	T Mécanique des fluides et applications.	PIVETEAU.....	T Géologie.
Ch. JACOB.....	T Géologie.	ROCARD.....	T Physique.
P. PASCAL.....	T Chimie générale.	H. CARTAN.....	Calcul différentiel.
M. FRÉCHET.....	T Calcul des probabilités et Physique mathématique.	SCHAEFFER.....	T Physiologie des fonctions.
Mme RAMART-LUCAS.	T Chimie organique.	LAFFITTE.....	Chimie (P. C. B.).
FOCH	T Mécanique physique et expérimentale.	FAVART.....	Calcul des Probabilités et Physique mathématique.
PAUTHENIER.....	T Electrotechnique générale.	COULOMB.....	T Physique du Globe.
DE BROGLIE.....	T Théories physiques.	M ^{lle} COUSIN	T Biologie animale (P.C.B.).
JOB.....	T Chimie générale.	A. CHRÉTIEN.....	Chimie (P.C.B.).
PRENANT	T Anatomie et Histologie comparées.	P. DRACH	Zoologie.
COMBES.....	T Physiologie végétale.	KASTLER.....	Physique.
GARNIER.....	T Géométrie supérieure.	CHATELET.....	T Arithmétique et théorie des nombres.
PÈRÈS	T Mécanique rationnelle.	EPHRUSSI.....	T Génétique.
HACKSPILL.....	T Chimie minérale.	WURMSER.....	T Biologie physico-chimique.
LAUGIER	T Physiologie générale.	BAUER.....	T Chimie-physique.
TOUSSAINT.....	T Technique aeronautique.	RIVIÈRE.....	Géologie (P. C. B.).
M. CURIE.....	T Physique (P. C. B.).	GAUTHERET.....	Biologie Végétale (P.C.B.)
G. RIBAUD	T Hautes températures.	LUCAS.....	Physique.
CHAZY.....	T Mécanique analytique et Mécanique céleste.	MAX MORAND.....	Physique.
CROZE	T Physique théorique et Physique céleste.	ARNULF.....	Optique appliquée.
DUPONT.....	T Théories chimiques.	A. THOMAS.....	Evolution des êtres organisés.
VALIRON	T Calcul différentiel et calcul intégral.	SOLEILLET.....	Physique.
BARRABÉ.....	T Géologie structurale et géologie appliquée.	FORTIER.....	Mécanique expérimentale des fluides.
VAVON.....	T Analyse et mesures chimiques.	DANJON.....	T Astronomie.
G. DARMOIS.....	T Mathématiques générales.	FROMAGEOT.....	Chimie Biologique.
Jacques BOURCART.	Géographie physique et Géologie dynamique.	LAPORTE.....	Physique générale et Radioactivité.
AUBEL	T Chimie biologique.	JANET	Mathématiques générales.
M ^{me} JOLIO-CURIE.	T Physique générale et Radio-activité.	PETIT.....	T Biologie maritime.
PLANTEFOL.....	T Botanique.	QUENEY.....	T Météorologie et dynamique atmosphérique.
CABANNES.....	T Recherches physiques.	GALLIEN.....	Biologie animale (P.C.B.).
GRASSÉ.....	T Évolution des êtres organisés.	EICHHORN.....	Biologie végétale (P.C.B.).
PRÉVOST.....	T Chimie organique.	DE CUGNAC.....	Biologie végétale (P.C.B.).
BOULIGAND.....	T Application de l'analyse à la géométrie.	LAVAL.....	Physique (P.C.B.).
		M ^{lle} CAUCHOIS	Chimie-Physique.
		THELLIER.....	Physique du Globe.
		AUDUBERT.....	Electrochimie.
		L'HÉRITIER.....	Génétique.
		GRIVET.....	T Radioélectricité.
		PONCIN.....	Mécanique des fluides.
		THIRY	T Mécanique appliquée.
		DUBREIL.....	Mathématiques générales.
		QUELET.....	Chimie (P. C. B.).
		JUNG.....	Géologie.

Secrétaire.....

CH. MONIER

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

A MON MAÎTRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE

GEORGES DUPONT

Directeur de l'Ecole Normale Supérieure
Professeur à la Faculté des Sciences

Témoignage de mon très respectueux attachement.

A MONSIEUR EDMOND BAUER
Professeur à la Faculté des Sciences

En hommage de ma très respectueuse admiration.

A MONSIEUR E. AUBEL
Professeur à la Faculté des Sciences

*En très respectueux hommage et en remerciement
pour le bienveillant intérêt qu'il m'a toujours porté.*

A L'INSTITUT PASTEUR

A MONSIEUR JACQUES TRÉFOUEL

Membre de l'Académie des Sciences et de l'Académie de Médecine
Directeur de l'Institut Pasteur

Très respectueux témoignage de gratitude.

A MONSIEUR GABRIEL BERTRAND

Membre de l'Académie des Sciences
Membre de l'Académie de Médecine et de l'Académie d'Agriculture
Professeur honoraire à la Faculté des Sciences
Membre du Conseil d'Administration de l'Institut Pasteur

En très respectueux hommage.

A MON MAÎTRE

MONSIEUR MICHEL MACHEBŒUF

Professeur à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux
Chef de Service à l'Institut Pasteur de Paris

*Qui m'a inspiré et constamment guidé
dans la réalisation de cette thèse.*

*En respectueux hommage d'admiration
et de profonde gratitude.*

*Modeste témoignage de mon sincère attachement.
et de ma très vive affection.*

A TOUS MES CAMARADES DE L'INSTITUT PASTEUR
ET DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE

A LA MÉMOIRE DE MON GRAND-PÈRE

MAX POLONOVSKI

A MON PÈRE

MICHEL POLONOVSKI

Membre de l'Académie de Médecine
Professeur à la Faculté de Médecine de Paris

A MA MÈRE ET AUX MIENS

ACTION DES AMINES QUATERNAIRES A CHAÎNE GRASSE SUR LES PROTÉINES, LES LIPIDES ET LES CÉNAPSES LIPOPROTÉIQUES

Par JACQUES POLONOVSKI

INTRODUCTION

On sait généralement très peu de choses sur le mode d'action biochimique des antiseptiques dont les propriétés bactéricides ont, le plus souvent, été découvertes par hasard ou par analogie. Ces dernières années ont vu se développer des travaux ayant justement pour but d'éclaircir les points d'insertion des antibiotiques dans les processus métaboliques cellulaires. Nous croyons que l'étude que nous avons entreprise sur l'action biochimique des amines quaternaires grasses est susceptible d'y contribuer.

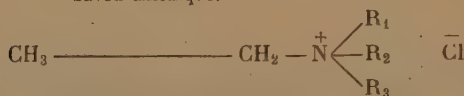
Les amines quaternaires à longue chaîne sont utilisées industriellement depuis une quinzaine d'années. Ces dérivés se rapprochent des savons par leur structure chimique et par leurs propriétés émulsionnantes, mouillantes et détersives ; il s'agit en effet d'un ion à chaîne grasse. Les savons ordinaires sont les sels alcalins d'anions gras, tandis que ces amines sont des sels de cations gras. Les premiers sont dits savons ou détergents anioniques, les seconds, *savons ou détergents cationiques* ⁽¹⁾.

(1) A côté de ces détergents ioniques (anioniques et cationiques) on possède aujourd'hui une nouvelle classe de détergents neutres ou non ioniques (cf. revue générale par H. A. Goldsmith (122)) : ce sont en général des produits de condensation d'oxyéthylène, d'alcools et d'acides gras, ils diffèrent absolument des savons. Nous ne les citons donc ici que pour mémoire. Nous ne parlerons pas non plus des détergents amphotères qui ne sont pas encore entrés dans le domaine pratique : la lécithine en serait un représentant naturel.

On peut les schématiser ainsi :



Savon anionique.

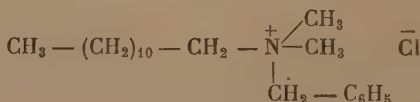


Savon cationique.

A cause de cette inversion de charges, on donne souvent aux savons cationiques le nom de « savons inversés ». On les dénomme également dans certains pays de langue anglaise « quats » pour abréger « quaternary ammonium compounds ». D'autres dérivés synthétiques analogues possèdent un cation phosphonium, stibonium, sulfonium, arsonium et jouissent de propriétés analogues. Nous proposons donc pour désigner ces cations gras le terme plus général de *saponium* exprimant à la fois leur structure de savon et de cation.

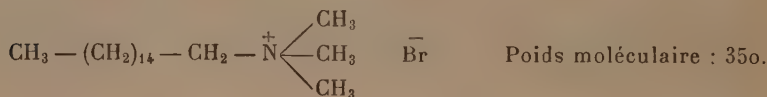
On connaît actuellement de nombreux saponiums ⁽¹⁾. Ceux que nous avons étudiés sont les suivants, rangés d'après la nature de leur chaîne grasse :

1° *Chaîne aliphatique simple*. — C'est le cas du *zéphirol* (que nous avons presque toujours utilisé) ou chlorure de dodécylbenzyltriméthylammonium :



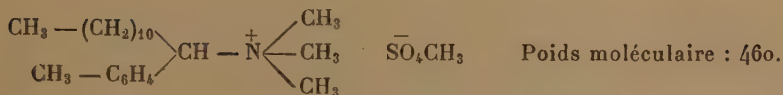
Ce corps, breveté par I. G. Farbenindustrie (B. F. 771 746), est préparé par action du chlorure de benzyle sur la triméthyl-dodécylamine. En réalité il s'agit d'un mélange de dérivés dans lesquels la chaîne aliphatique varie de C₈ à C₁₈ avec une prédominance importante de la chaîne en C₁₂ (Poids moléculaire moyen : 340).

C'est aussi le cas du *cétavlon* (I. C. I.) ou bromure de cetyltriméthylammonium, également utilisé industriellement dans la lissolamine V :



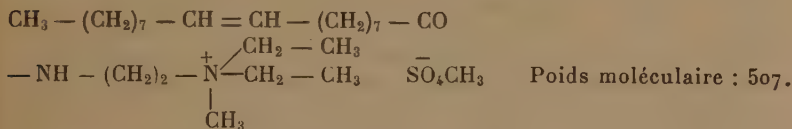
2° *Chaîne ramifiée*. — A ce type nous rattachons le *désogène* (Geigy) ou méthylsulfate de paraméthylphényl-1 dodécyltriméthylammonium :

⁽¹⁾ On pourra consulter à ce sujet de nombreuses revues générales (7, 11, 35, 54, 120, 247, 334, 350, 380, 423, 434) et trouver des références concernant leurs propriétés et leurs modes de préparation (94, 97, 98, 112, 168, 169, 179, 180, 181, 202, 210, 212, 213, 214, 216, 218, 219, 352, 377, 404, 413, 422, 431).

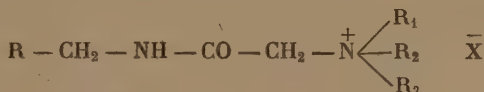


Ce corps se rapproche des saponiums à deux chaînes longues.

3^o *Chaîne portant une fonction amide.* — La *sapamine MS* (Ciba) (1) ou méthylsulfate d'oléylaminoéthyl-diéthylméthylammonium est une amide de l'acide oléique :



Le *quartamon* (2) répond à ce type de formule :



Ces amines quaternaires synthétiques ne sont pas sans relation avec un grand nombre d'amines naturelles dont le rôle physiologique est souvent important : dérivés de la choline, lécithine, lysocithine.

Certains alcaloïdes sont même des dérivés ammoniums quaternaires (alcaloïdes du curare (51), muscarine (106)) et on attribue à leur structure cationique les propriétés curarisantes et muscariniques de ces corps ; la plupart des amines quaternaires synthétiques ont une pareille action physiologique : curarisante, nicotinique et muscarinique à des degrés divers.

A l'heure actuelle, les savons cationiques ont au moins deux grandes voies d'utilisation pratique :

1^o Ils servent à de nombreux usages industriels, soit comme émulsionnants en milieu acide, soit comme mouillants, soit enfin pour leurs propriétés de fixation des anions (voir des revues générales comme celles de J. P. Sisley (380), J. Ripert et J. P. Sisley (354, 355), de J. W. McBain (248, 241).

2^o Leurs propriétés antibiotiques et bactériostatiques (3) ayant été entrevues dès 1916 par Jacobs (174, 175, 176), c'est en réalité des travaux de G. Domagk en 1935 (75) que débuta l'essor de ces composés dans les

(1) Nous sommes heureux de pouvoir remercier ici les établissements Ciba qui nous ont procuré la sapamine MS et la sapamine CH.

(2) Nous remercions vivement Mlle Benoit, de l'Institut Pasteur, qui nous a donné du quartamon préparé par synthèse dans son laboratoire.

(3) Références : 12, 79, 84, 85, 88, 90, 91, 97, 118, 119, 135, 143, 157, 305, 335, 341, 350, 373, 412, 413.

domaines si divers de la désinfection ⁽¹⁾ et de la thérapeutique ⁽²⁾ : alors qu'à pH neutre les savons ordinaires n'agissent que sur les bactéries Gram +, les saponiums sont actifs à peu près également sur les bactéries Gram + et — et à des concentrations souvent très inférieures aux savons anioniques (jusqu'à 10^{-5}).

Nous nous sommes proposé d'étudier l'action des savons cationiques sur les éléments de la matière vivante. La matière vivante est constituée de deux catégories de molécules : de petites molécules (ions, acides aminés, oses, etc.) qui évoluent au contact de grosses molécules (protéides, acides nucléiques, polyholosides, etc.). Il est infiniment probable que ces dernières entrent dans un réseau par des liaisons dont nous commençons à peine à envisager les différents aspects (liaisons salines, liaisons hydrogènes, liaisons par forces de Van der Waals). Il s'agit toujours de cénapses au sens le plus large, unissant dans un même système protéines, lipides, glucides, etc. On est peu renseigné sur la structure intime de ces cénapses, mais la majorité des auteurs se range à l'idée qu'ils présentent deux phases (59) : l'une hydrophile, formée par les radicaux polaires acides, amines ou alcools, l'autre hydrophobe constituée par les chaînes hydrocarbonées des acides aminés, des acides gras. Dans la phase hydrophile évolueraient les molécules d'eau qui gonflent l'édifice et véhiculent les petites molécules hydrophiles (glucose, acides, bases, etc.). Dans la phase hydrophobe seraient dissoutes les molécules lipidiques ou lipoïdiques (graisses neutres, stérols, carotènes, etc.). C'est à l'interface de ces deux phases intimement intriquées, épousant la forme même des molécules protéiniques (forme sans doute extrêmement complexe étant donnée la spécificité diastasique ou immunologique des grosses molécules naturelles), que s'exercent probablement les forces si puissantes auxquelles il faut rapporter l'activité enzymatique anabolique et catabolique de la matière vivante.

Une étude complète de l'action d'un corps sur la matière vivante doit donc envisager d'abord une étude détaillée de l'effet du corps sur les éléments isolés de la matière vivante, puis sur les liaisons qui les unissent dans la cellule et enfin sur les activités de la matière vivante. C'est donc cet ordre que nous suivrons pour l'exposé des recherches que nous avons entreprises : action des savons cationiques sur les protéines et sur les lipides isolés ; puis action des savons cationiques sur les cénapses lipido-protéiniques naturels ; et enfin action des savons cationiques sur la cellule elle-même (action sur la membrane ⁽³⁾ et sur les systèmes enzymatiques).

⁽¹⁾ 120, 146, 170, 194, 208, 209, 247, 346.

⁽²⁾ 86, 105, 163, 167, 168, 169, 192, 200, 286, 287, 418 (Revue générale : 54, 120, 121, 346, 411, 423). Elles inactivent certains virus (73, 197, 199, 201, 319, 390, 391, 392), certaines toxines (296, 297, 298). Elles sont cytolytiques (154), cysticides (100), fongicides (89), inhibitrices pour le développement des plantes supérieures (363), agents de mutations (293, 292). Enfin, elles sont toxiques pour les animaux, à des doses relativement faibles (139, 153, 165, 417, 421).

⁽³⁾ Nous utiliserons au cours de ce travail le nom de « membrane » cellulaire pour désigner la surface limitante cytoplasmique.

I. — ACTION DES SAVONS A CATION ACTIF SUR LES PROTÉINES

L'étude des interactions entre protéines et détergents a commencé à se développer très récemment et le nombre des chercheurs qui s'y intéressent marque l'importance biochimique des problèmes posés. Notons que ces travaux sont presque exclusivement limités à l'étude des détergents anioniques (savons ordinaires ou détergents synthétiques sulfonés ou sulfatés). Les savons cationiques se comportent souvent de la même manière. Cependant les protéides et les systèmes attachés aux protéides, bien qu'amphotères, ont des propriétés différentes selon le pH et en particulier selon qu'ils sont anions ou cations ; leur comportement est loin d'être symétrique par rapport à leur pH isoélectrique. Aussi le signe de l'ion détergent n'est-il pas indifférent ; et l'étude des interactions entre protéines et savons cationiques, sans se superposer à l'étude des savons anioniques, apporte des faits nouveaux et un complément indispensable à cet ensemble de recherches ⁽¹⁾.

Les travaux effectués avec les détergents anioniques ont été bien résumés dans un certain nombre de revues générales récentes (120, 336, 411). Rappelons ici les principaux résultats obtenus :

Protéines et savons s'associent en solution pour former des complexes protéine-savon. Ces complexes ont été mis en évidence par diverses études physiques ⁽²⁾ :

- électrophorèse (15, 238, 339, 340),
- vitesse de diffusion (239, 300, 303, 337),
- viscosité (300, 303),
- pouvoir rotatoire (72),
- biréfringence d'écoulement (109, 237),
- tension superficielle et formation de couches monomoléculaires mixtes (36, 37, 72, 308).

Putnam et Neurath, en particulier, travaillant sur la sérumalbumine cristallisée (A) et le dodécylsulfate de sodium (D), ont trouvé deux complexes principaux AD_n et AD_{2n} renfermant 0,22 g. et 0,45 g. de savon par gramme d'albumine.

(1) On peut aussi rapprocher des détergents ioniques certains composés organiques non ioniques comme les alcools. Les courbes de précipitation des protéines par les alcools (103) rappellent celles que nous obtenons avec les détergents.

(2) Références : 14, 16, 31, 55, 56, 95, 96, 178, 236, 271, 272, 274, 280, 307, 312, 313, 314, 353, 433.

Ces complexes sont solubles en milieu alcalin (pH supérieur au pH isoélectrique). Au-dessous du $pH i$, au contraire, on observe la précipitation d'un complexe, qui aurait la même composition (AD_n) que le complexe soluble au-dessus du $pH i$. Pour une concentration en savon correspondant à AD_{2n} (ou supérieure) le complexe redevient soluble. D'après les auteurs précédents, le premier complexe correspondrait à la saturation des fonctions basiques de la protéine par des anions gras. La structure du second complexe donne lieu à plusieurs interprétations dont nous reparlerons plus loin (p. 14).

La formation du complexe s'accompagne d'une modification de la protéine (dénaturation) (302) :

- apparition de fonctions — SH (5, 6, 289),
- augmentation de l'asymétrie moléculaire (237, 300, 379),
- transformation de protéines globulaires en fibrillaires (9, 10, 309),
- changements de solubilité, de capacité de cristallisation après élimination du savon (338),
- dissociation moléculaire (288, 383, 386; résultats discutés (301)),
- inactivation de propriétés physiologiques :
 - virus (17, 18, 39, 197, 206, 384, 386, 390, 391, 392),
 - enzymes (110, 166, 278, 318, 378, 414),
 - hormones (231),
 - toxines (19, 21, 222, 223, 224, 249, 365, 366, 416).

Les savons catalysent également l'hydrolyse des fonctions amides de la protéine en milieu acide (388, 389).

Ils inhibent la coagulation par certains acides ou par la chaleur (5, 30, 32), ainsi que l'action de l'urée (87).

Enfin ils permettent de dissoudre des protéines insolubles (directement (407) ou après réduction des fonctions — S — S — (kératines) : (186, 236)).

Les seuls travaux, que nous relevions dans la bibliographie, relatifs à l'action sur les protéines des détergents cationiques, ont trait à la précipitation des protéines; ce phénomène est en effet le plus frappant quand on est habitué aux détergents anioniques; ceux-ci ne précipitent les protéines qu'au-dessous du pH isoélectrique alors que les saponiums les précipitent au dessus de ce $pH i$: la plupart des protéines habituellement utilisées (ovalbumine, protéines de sérum) ayant un $pH i$ nettement inférieur à 7, il se trouve que, dans les conditions physiologiques, elles ne précipitent qu'avec les savons cationiques.

Nous commencerons notre étude par celle de la précipitation des protéines en fonction des conditions physiques: pH , concentration, présence d'électrolytes. Nous étudierons ensuite les complexes formés entre protéines et savons cationiques.

I. — PRÉCIPITATION DE LA SÉRUMALBUMINE PAR LES SAVONS CATIONIQUES

L'action précipitante des savons à cation actif sur les protéines, signalée pour la première fois par R. Kuhn et H. J. Bielig en 1940 (211), n'a fait l'objet que d'un nombre très restreint de travaux : ces auteurs ayant constaté que les protéines ne précipitaient qu'à un pH supérieur au pH isoélectrique, W. G. Jaffé (177) en 1943 proposa d'utiliser cette propriété pour déterminer le pH i des protéines : il trouva par cette méthode des pH isoélectriques un peu inférieurs aux pH i déterminés par les autres méthodes. K. H. Schmidt (364), la même année, amorça une étude plus détaillée de l'influence du pH , des concentrations en savon cationique et des concentrations salines. Enfin, E. Pfankuch et G. A. Kausche (319) comparent l'agrégation de virus-protéines à la précipitation d'albumines par une vingtaine de savons inversés (1).

L'étude de ce phénomène nous paraît spécialement intéressante, tant par son importance théorique que par ses utilisations pratiques.

Nous avons tout d'abord expérimenté sur la sérumalbumine cristallisée, préparée à partir de sérum de cheval selon la technique classique. Les résultats ont été partiellement publiés (325) ; nous les rappelons ici brièvement.

1° PRÉCIPITATION DE LA SÉRUMALBUMINE EN FONCTION DE LA QUANTITÉ DE ZÉPHIROL. — 1° A pH inférieur à un certain seuil (6,2 pour l'albumine dialysée 12 jours à pH 4, 7,5 pour une autre dialysée 6 jours à partir de pH 6), l'albumine ne précipite pas quelle que soit la quantité de zéphirol ajoutée : on n'observe au maximum qu'un trouble de la solution.

2° A pH 8 et 9 la précipitation commence brusquement pour une quantité de zéphirol déterminée, puis elle passe par un maximum et diminue ensuite rapidement quand on ajoute du zéphirol. Pour les plus grandes quantités de zéphirol le précipité ne se fait plus ou se dissout dans l'excès de zéphirol.

3° A pH supérieur à 10 ou 11, il en est de même jusqu'au maximum de précipitation, mais ensuite la solubilisation dans l'excès de zéphirol ne se fait que très difficilement et pour une quantité de zéphirol bien plus considérable.

Il y a donc une zone de précipitabilité de la protéine en fonction de la concentration de zéphirol.

(1) Le travail de L. F. Holmes (156) porte également sur la précipitation de protéines par les saponiums, au cours d'une étude sur l'action des détergents sur les anticorps.

Les courbes expriment mieux que des tableaux de chiffres les résultats obtenus (avec l'albumine dialysée 6 jours).

La précipitation de l'albumine ne dépend pas seulement de la

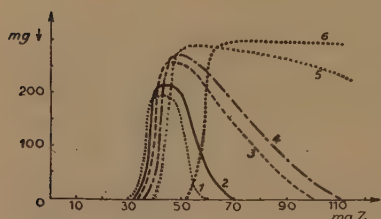


Fig. 1. — (240 mg. alb.) 6 courbes nos 1 à 6 pour 6 pH : 8,0 8,2-8,7-9,2-10,5-12.

concentration du milieu en albumine ou en zéphirool, mais du rapport entre les quantités de zéphirool et d'albumine présentes. Il ne s'agit pas d'un relargage par action de sels mais d'une *liaison stœchiométrique* entre la protéine et le cation. Le précipité est soluble dans un excès d'albumine ou de zéphirool (tant que le pH n'est pas trop élevé). Il y a donc une valeur

critique de la concentration relative en zéphirool au-dessous de laquelle les composés formés sont solubles. Cette valeur dépend du pH et des ions présents dans le milieu.

2° PRÉCIPITATION EN FONCTION DU pH. — On peut faire l'étude de la précipitation en fonction du pH, à quantité de zéphirool constante.

Il y a donc aussi une zone de précipitabilité en fonction du pH. Cette zone se déplace en fonction de la concentration en zéphirool. Il

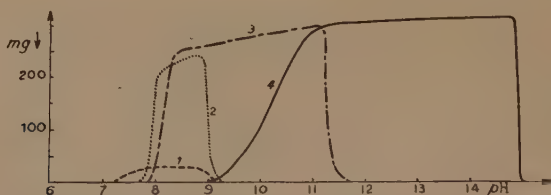


Fig. 2. — 4 quantités différentes de zéphirool : 30 mg.-40 mg.-50 mg.-120 mg.

existe cependant une *valeur de pH minimum au-dessous de laquelle la sérumatbumine n'est pas précipitable* quelle que soit la concentration en zéphirool (ce pH diffère selon la préparation d'albumine : 6,5 pour l'une, 7,5 pour l'autre⁽¹⁾). Il existe aussi une *quantité minimum de zéphirool au-dessous de laquelle la précipitation ne se fait pas* quel que soit le pH (zéphirool/protéine voisin de 13/100).

3° INFLUENCE DE LA DILUTION. — Quelle que soit la quantité d'eau ajoutée pour un pH donné, le précipité se forme dans la même zone

(¹) Nous verrons plus loin qu'on peut attribuer cette différence entre les deux échantillons d'albumine, à la présence, en quantités différentes, d'une petite quantité d'ions minéraux.

de concentration relative en zéphirol et en protéine. La précipitation dépend donc bien uniquement du rapport saponium/protéine.

Mais en milieu très dilué le mélange des quantités correspondantes de saponium et de protéine ne précipite pas immédiatement; le liquide se trouble et le précipité ne se rassemble qu'après un temps variant de quelques minutes à plusieurs heures. Y a-t-il encore un précipité aux très grandes dilutions? Nous savons que les saponiums, comme les savons anioniques, se comportent comme des micelles colloïdales au-dessus d'une concentration critique ⁽¹⁾ alors qu'à une concentration inférieure les molécules se séparent et les propriétés physiques et physico-chimiques changent totalement. Si donc, la structure micellaire du saponium est aussi indispensable à la précipitation des protéines, il doit y avoir une dilution critique au-dessus de laquelle le précipité n'apparaît pas.

En fait l'expérience nous a montré qu'à une concentration de 3×10^{-4} M., inférieure au point critique du saponium, le précipité se forme encore : la « combinaison » de la protéine avec le saponium se fait donc quel que soit l'état physique de ce dernier, et même à ces hautes dilutions les molécules se rassemblent en micelles pour flocculer. La présence de protéines a donc une influence sur l'état du saponium, et la notion de point critique perd alors de sa valeur. Il est très possible que le mélange protéine-saponium ait encore un point critique, mais sûrement différent de celui du saponium seul.

4° INFLUENCE DES IONS MINÉRAUX. — Nous avons évité jusqu'ici d'introduire dans le milieu des ions minéraux autres que la petite quantité de Na^+ contenue dans la soude $n/10$ et le Cl^- apporté par le zéphirol.

Si nous ajoutons des sels alcalins (tampons boratés, phosphatés, carbonatés, chlorure de sodium, sulfate de sodium) en quantité variable, les courbes de précipitation par le zéphirol se trouvent modifiées.

(1) Il existe un point critique où l'état physique des savons change nettement : à une concentration inférieure, le savon est dispersé à l'état moléculaire; au-dessus de cette concentration limite, l'excès de savon est aggloméré en micelles. La concentration critique dépend de la longueur de la chaîne :

C_{10}	0,04 M
C_{12}	0,013 M
C_{14}	0,004 M
C_{16}	0,0008 M
C_{18}	0,0003 M (49, 152, 432)

La présence de molécules insolubles dans l'eau intervient aussi dans l'abaissement du point critique : des savons, qui ne forment absolument pas de micelles au-dessous de la concentration critique quand ils sont seuls en solution (203), commencent à en former lorsqu'ils sont en présence de molécules insolubles (204).

1° La plus petite quantité de zéphirol nécessaire pour précipiter l'albumine augmente avec la quantité de sel ajoutée. Cette augmentation rappelle celle que nous observons par l'addition de soude simplement. Elle paraîtrait donc liée à la quantité d'ions Na^+ présente dans le milieu. Elle ne dépasse pas la valeur déjà notée de 40 mg. de zéphirol pour 100 mg. d'albumine.

On peut chercher à relier le point de début de précipitation à la quantité de sel présente : une solution contenant 100 mg. d'albumine est amenée à pH 8,2 et additionnée de quantités croissantes de sel de sodium. On note pour chaque concentration la plus petite quantité de zéphirol nécessaire pour obtenir un début de précipitation.

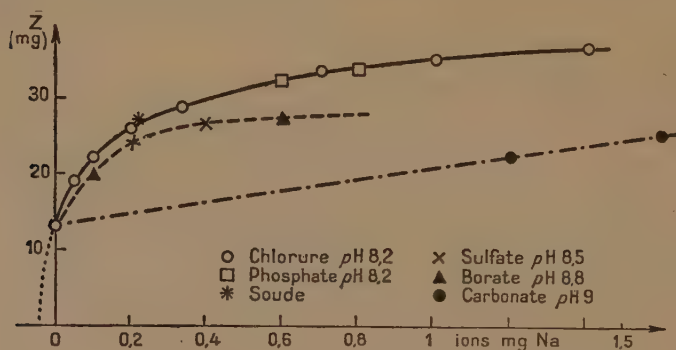


Fig. 3. — Influence des divers sels de sodium sur la dose minimale de zéphirol (z).

La solution d'albumine contenait encore une petite quantité d'ions minéraux : ceci peut expliquer que les courbes ne partent pas de l'origine O.

L'importance des anions est ici mise en évidence : ils se classent en trois groupes : les chlorures et les phosphates qui semblent équivalents à la soude elle-même, sont ceux qui ont la plus forte action solubilisante. Ensuite les sulfates et borates paraissent moins actifs. Enfin les carbonates n'agissent qu'à forte concentration. Nous n'avons pas utilisé le nitrate qui précipite le zéphirol.

Cette distinction entre les anions a été soulignée également page 65 dans l'action solubilisante d'un protéide au-dessous de son pH isoélectrique.

2° La pente de la partie ascendante de la courbe de précipitation par rapport à la teneur en zéphirol (courbe 1, p. 8) diminue avec la quantité de sel ajoutée : le maximum de précipitation se trouve donc déplacé assez largement vers les grandes teneurs en zéphirol.

Il en est de même de la pente de la partie descendante pour les

fortes concentrations salines. En présence de sels, le précipité est relativement moins soluble dans l'excès de zéphirol.

Voici des courbes particulièrement significatives, obtenues à partir de 110 mg. d'albumine à pH 8,2 et 10,5 : les courbes de gauche sont obtenues en l'absence de sels, celles de droites en présence de 90 mg. de chlorure de sodium (soit 1,4 ion mg Na⁺ par 100 mg. d'albumine).

Les sels minéraux ont donc une influence remarquablement nette sur la précipitation dans cette zone de pH supérieure au pH minimum de précipitation. Mais au-dessous de ce pH critique, ils provoquent également la précipitation du complexe protéine-zéphirol au voisinage de pH 4-5, c'est-à-dire du point isoélectrique de l'albumine. Dans ce cas, il s'agit d'un relargage par action de sels.

Les sels de métaux autres que le sodium (alcalino-terreux, cuivre, etc...) ont un pouvoir analogue à celui des sels de sodium sur

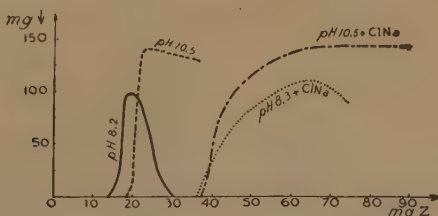


Fig. 4. — Influence de 90 mg. de ClNa pour 110 mg. d'albumine.

les quantités minimale et optimale de zéphirol à ajouter pour précipiter la protéine⁽¹⁾ ; on observe de plus un déplacement du pH minimum de précipitation vers les pH élevés (voir p. 13) ; inversement, la présence du zéphirol empêche la précipitation du complexe protéine-métal pour les pH inférieurs à ce pH limite.

5° INFLUENCE DE LA NATURE DU SAVON CATIONIQUE. — Les trois saponiums zéphirol, sapamine MS et désogène agissent de la même façon sur la sérumalbumine. Mais les doses de saponium qui se correspondent sont différentes : ainsi 16 mg. d'albumine à pH 8,8 précipitent à partir de 2,4 mg. de zéphirol jusqu'à 3 mg. Les doses correspondantes de sapamine sont 3,8 mg. à 4,8 mg. et de désogène 2,6 mg. à 3,3 mg. Ces doses sont presque équimoléculaires : si nous affectons les trois saponiums d'un coefficient proportionnel au poids moléculaire et d'un coefficient proportionnel aux doses nécessaires pour précipiter

(¹) La précipitation de la ferritine (protéine contenant 20 o/o de fer) nécessite une grosse proportion de zéphirol (Kuhn et Bielig (211)) ; peut-être ce fait est-il dû justement à la présence du fer dans la protéine.

l'albumine, nous obtenons les valeurs suivantes en donnant arbitrairement au zéphirol la valeur 100.

	Poids moléculaire	Précipitation d'albumine
Zéphirol	100	100
Sapamine MS	150	157
Désogène	135	109

6° INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS. — L'étude qualitative de la précipitabilité des protéines (caséine, ovalbumine, sérumglobuline, etc. (211)) par les savons à cation actif fait aussitôt songer à la neutralisation des charges négatives de la protéine par le cation, et ainsi à la précipitation d'un sel ⁽¹⁾ : pour ces protéines, en effet, la précipitation paraît à très peu près s'effectuer dans la zone de pH supérieure au point isoélectrique. Cette hypothèse, qui a servi à Jaffé pour proposer une méthode simple de détermination du pH isoélectrique, se trouve apparemment contredite dans le cas de la sérumalbumine. Est-ce une exception ? N'y a-t-il pas un facteur mal connu qui soit responsable du décalage net existant entre le pH isoélectrique et le pH limite de précipitation. Nous avons constaté l'importance de la présence de cations (et en particulier du calcium et du cuivre) sur la valeur du pH limite. En outre, ce point dépend de la préparation

(1) Les savons sont constitués par un gros ion. Leur comportement dépend pour une large part de leurs propriétés ioniques (104, 170).

Certains anions donnent avec les savons cationiques des sels insolubles : trichloracétate, phosphotungstate, silicotungstate, picrate, iodure, ferro et ferri-cyanure, permanganate, etc., un excès de saponium dissout le précipité.

D'autres ne donnent en aucun cas de combinaison insoluble : chlorure, phosphate, borate, nitrite, acétate...

Enfin certains donnent des combinaisons plus ou moins solubles selon le cation étudié : sulfate, nitrate.

Les sels d'acides gras (mélanges de saponiums et de savons) sont aussi insolubles dans l'eau. Mais ici un excès de l'anion, comme un excès de cation, est capable de dissoudre le précipité. Le précipité obtenu pour un rapport équimoléculaire est lui-même encore relativement hydrophile : facilement émulsionné par un léger excès de l'anion ou du cation, il ne se sépare que difficilement.

Solubilité dans l'éther. — Le précipité (iodure, nitrate, trichloracétate, ricinoléate, etc., de saponium) se rassemble à la température ordinaire en une couche liquide à la surface de l'eau. Lorsqu'on opère en présence d'éther, on constate que les combinaisons insolubles dans l'eau passent dans l'éther, entraînant ainsi un anion minéral, par exemple, dans ce solvant organique : rappelons que la solubilité du permanganate de zéphirol dans l'éther a été utilisée pour le titrage des solutions de zéphirol (104).

d'albumine utilisée. Avec une sérumalbumine de cheval, dialysée douze jours à partir d'un pH acide (pH 4) afin d'éliminer le mieux possible les cations minéraux, nous avons obtenu un pH critique voisin de 6,5 et en même temps une valeur critique du rapport zéphirol/protéine très inférieure aux précédentes et voisine de 3 mg. de zéphirol pour 100 mg. d'albumine. En ajoutant à cette préparation des traces d'ions calcium (de l'ordre de 0,01 à 0,1 ion mg. pour 100 mg. d'albumine) nous avons trouvé une élévation du pH critique vers pH 7 à 8 et une élévation très nette de la valeur critique du rapport zéphirol/protéine. En conclusion :

1° L'absence de précipitation pour les doses de zéphirol inférieures à la valeur critique du rapport zéphirol-protéine, semble due à la teneur de l'albumine en cations concurrents (Ca^{++} , Cu^{++} , Fe^{++} , etc.) ;

2° La valeur du pH critique de précipitation de l'albumine dépend également de cette teneur en cations et tend vers le pH iso-électrique quand on élimine les ions minéraux.

L'exemple de l'albumine nous montre qu'on peut déterminer le pH limite de précipitation d'une protéine par un saponium (peut-être caractéristique de la protéine), mais qu'il faut tenir compte d'une part de l'influence du rapport saponium/protéine et de l'influence des sels minéraux présents dans le milieu (ou complexifiés avec les protéines), d'autre part que ce pH n'est pas strictement le pH isoélectrique. En conclusion, pour déterminer le pH limite, on devra tracer la courbe du maximum de précipitation de la protéine par des quantités variables de saponium, en fonction du pH . Nous avons tracé la courbe obtenue avec l'une des préparations de sérumalbumine cristallisée trois fois et dialysée 6 jours : cette courbe est l'enveloppe des courbes de la figure 2, page 8. (Il subsiste une petite indétermination pour le point de rencontre de la courbe avec l'axe des abscisses : nous l'estimons ici voisin de 7,7).

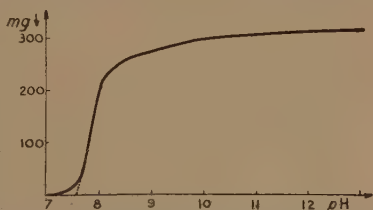


Fig. 5. — Maximum de précipitation en fonction du pH .

Quel est le mécanisme de cette précipitation ?

Nous avons montré qu'il ne s'agit pas d'un relargage par le saponium, mais d'un complexe stœchiométrique qui précipite à partir d'un certain rapport zéphirol/protéine et au-dessus d'un certain pH critique (plus ou moins proche du pH isoélectrique). Ce complexe est aussi soluble dans un excès de saponium.

D'après les travaux de Putnam et Neurath (339) et de Pankhurst et Smith (313) sur les complexes protéine-savon anionique, le savon se fixerait sur les groupes polaires de la protéine ; et, les groupes apo-

laïres étant ainsi orientés vers l'extérieur, le complexe deviendrait insoluble. Les rapports optimaux de précipitation savon/protéine seraient en relation avec le nombre de groupes basiques libres de la protéine. La solubilisation dans un excès de savon donne lieu à des interprétations diverses. Pour les uns, une seconde couche de savon inversement orientée et attirée par des forces de Van der Waals recouvrirait le complexe d'une couche polaire. Pour les autres, l'excès de savon ferait apparaître de nouveaux groupes polaires de la molécule protéinique.

Il est très vraisemblable que le cas des savons cationiques est analogue : les cations zéphirol se fixeraient par leurs groupes polaires sur les pôles acides de la protéine. Cette hypothèse est d'autant plus probable que le zéphirol se comporte dans ces conditions à peu près comme les cations lourds minéraux (mercure).

La liaison est plus forte qu'une simple liaison saline : les chaînes hydrophobes du saponium y participent peut-être ; nous discuterons ces possibilités après une étude physicochimique des complexes protéine-saponium.

Quant à la solubilisation dans l'excès de zéphirol, elle est, croyons-nous, la résultante de deux processus concomitants :

1° Une déformation des particules protéiniques : distorsion si on utilise un modèle analogue à ceux de Bressler et Talmud (33), dissociation de feuilletts dans le cas de la théorie de Dervichian (66, 67). Cette dissociation ferait apparaître de nouvelles faces sans doute hydrophobes de la molécule protéinique, capables de fixer de nouvelles molécules de zéphirol.

2° Une orientation inverse des chaînes de zéphirol, le groupe polaire hydrophile étant alors tourné vers la phase aqueuse, et la chaîne apolaire attirée par ces faces hydrophobes de la molécule protéinique.

Enfin, la solubilisation du complexe en milieu fortement alcalin peut s'expliquer partiellement par l'apparition de nouvelles fonctions acides (énolisation des liaisons peptidiques), mais elle est sans doute en relation avec la présence des ions Na^+ , comme semble l'indiquer le fait que tous les sels de sodium aient une action analogue. Les cations minéraux rendraient la molécule protéinique plus hydrophile : une plus grande quantité de zéphirol serait nécessaire pour rendre la cénapse saponio-protéique insoluble.

La sérumbalbumine est une protéine spécialement sensible à l'influence des ions minéraux ; en effet les autres protéines essayées (caséine, ovalbumine, sérumglobulines) précipitent à partir d'un pH limite voisin du pH isoélectrique, comme s'ils étaient moins influencés par les ions perturbateurs. Cependant, pour elles aussi on note une modification des courbes de précipitation en présence de sels minéraux.

2. — PRÉCIPITATION DES PROTÉINES DU SÉRUM PAR LES SAVONS CATIONIQUES

Nous n'avons pas encore tenu compte de l'influence d'une autre protéine sur la précipitation protéine-saponium. Or, dans l'étude de la précipitation d'un milieu biologique, on a toujours affaire à un mélange de protéines. Il est donc intéressant de chercher le comportement d'un milieu complexe tel que le sérum. Son importance biochimique en fait un matériel d'étude fondamental et nos résultats contribueront d'une part à une connaissance plus approfondie des protéines du sérum, d'autre part à nous renseigner sur la précipitation de mélanges de protéines par les savons cationiques.

À côté de la sérumalbumine purifiée, dont nous avons étudié le comportement, le sérum de cheval fournit par précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium, des globulines, précipitées par $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ à demi-saturation, dites globulines totales; de celles-ci on peut encore isoler, par une précipitation à 34 o/o de saturation en $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, des γ -globulines qui représentent une fraction grossièrement homogène à l'électrophorèse alors que les autres globulines (α et β) sont difficiles à obtenir isolées.

Nous avons donc étudié la précipitation du sérum total de cheval par le zéphirol, suivant les trois points de vue précédents : concentration en zéphirol, pH et influence des sels. Nous avons enfin complété cette étude par celle des γ -globulines ⁽¹⁾.

1. PRÉCIPITATION DU SÉRUM TOTAL. — a) *Précipitation en fonction de la teneur en zéphirol et du pH.* — 1° A $\text{pH} < 4$ le sérum ne précipite pas, quelle que soit la teneur en zéphirol.

2° A $\text{pH} 5$ la précipitation est faible et n'a lieu que de 0 à 20 mg. de zéphirol. A $\text{pH} 5$ elle croît de 0 à 10 mg. de zéphirol, reste à peu près constante jusqu'à 20 mg. et décroît ensuite pour retomber à 0 vers 50 mg. de zéphirol. A $\text{pH} 7$ et à $\text{pH} 8$ la courbe est sensiblement la même. La moitié des protéines du sérum environ est ainsi précipitable à ces pH et le précipité est soluble dans un excès de zéphirol.

3° Au-dessus de $\text{pH} 8$, le précipité ne se forme plus pour les très petites quantités de zéphirol : la courbe se déplace peu à peu vers les fortes teneurs en zéphirol. Le maximum de précipitation s'élève jusqu'à précipitation totale des protéines du sérum (à partir de $\text{pH} 10$ ou 11). La dissolution dans un excès de zéphirol est de plus en plus difficile et ne se fait plus lorsque le pH dépasse 10,5.

(1) Nous nous contenterons de résumer les résultats déjà publiés (326).

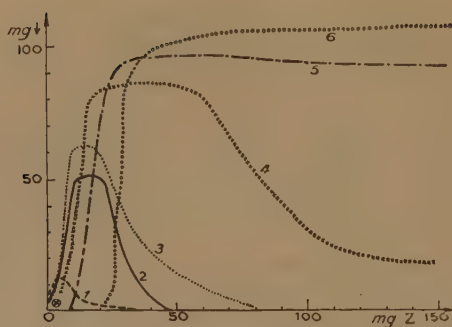


Fig. 6. — 6 courbes nos 1 à 6 pour 6 pH : 5-6-8-9,6-10,6-11.

Poids du précipité ($\downarrow$) obtenu à partir de 1 ml. de sérum en fonction de la dose de zéphirool (Z).

La figure 7 résume l'étude de la *précipitation en fonction du pH*.

Ici encore, comme dans le cas de l'albumine cristallisée, la précipitation ne dépend pas simplement des concentrations de protéines ou de zéphirool mais seulement du rapport zéphirool/protéine (complexes stœchiométriques).

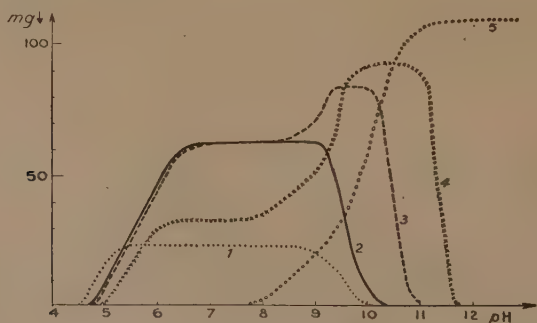


Fig. 7. — 5 quantités différentes de zéphirool : 5 mg.-10 mg.-20 mg.-30 mg.-100 mg.

Poids du précipité ($\downarrow$) obtenu à partir de 1 ml. de sérum par une quantité constante de zéphirool en fonction du pH.

Si on compare ces résultats avec ceux qu'on obtient avec la cristallumine, on remarque que la précipitation commence dès pH 4,5, qu'elle s'effectue selon deux courbes nettement différentes. Ces deux courbes correspondent-elles à la distinction albumine et globuline ? Le palier est nettement marqué dans la figure 8 qui représente la courbe du maximum de précipitation en fonction du pH (enveloppe

des courbes 7). Schmidt (364) obtient des résultats analogues. Mais, il affirme que la première partie de la courbe (de pH 4,5 à pH 8) représente la précipitation des globulines seules. Il observe même la présence de paliers secondaires qu'il attribue à chacune des trois fractions de globulines α , β et γ . Mais l'étude électrophorétique que nous avons faite (voir p. 24) est en contradiction formelle avec les conclusions de Schmidt.

Pour toutes les expériences précédentes, nous avons dilué le sérum de 1 à 8 cm^3 . La dilution, à elle seule, sans zéphirool aurait eu pour effet de précipiter une petite fraction euglobulinique. Pour étudier l'action des très petites doses de zéphirool sur le sérum, il convient donc d'éviter une telle dilution. Dans ces conditions (et à pH 7,3) rien ne précipite pour les très faibles doses de zéphirool (inférieures

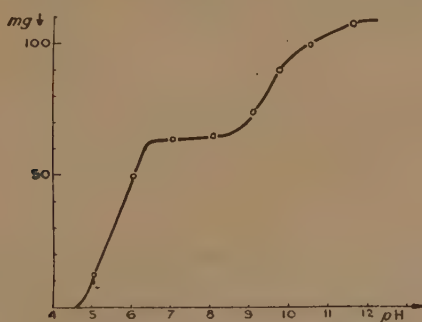


Fig. 8. — Maximum de précipitation en fonction du pH .

à 0,4 mg.). Nous constatons ensuite l'existence d'un palier de précipitation pour les doses de zéphirool allant de 1 à 5 ou 7 mg. par centimètre cube de sérum. A partir de 7 mg. de zéphirool, le sérum laisse précipiter une fraction beaucoup plus abondante. Le premier précipité est minime (7 à 10 mg. par cm^3 de sérum); il se forme très lentement : nous ne l'avons recueilli, par centrifugation, qu'après 8 heures de contact ⁽¹⁾.

Les résultats sont résumés dans le tableau et la courbe suivants :

Zéphirool .	0	0,4	0,6	0,8	1,0	1,25	1,50	2,0	2,50	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0
Poids du précipité	0	0,5	1 à 2	2,25	6,8	6,7	6,8	6,8	7,3	7,5	8,5	10	11	12	50	59

(Nous avons limité le tableau à la première partie de la courbe).

⁽¹⁾ Il arrive que le précipité soit moins dense que l'eau et se rassemble en surface.

Les chiffres sont exprimés en milligrammes par centimètre cube de sérum.

Nous étudierons plus précisément ce premier précipité au chapitre III : il s'agit d'une fraction très riche en lipides.

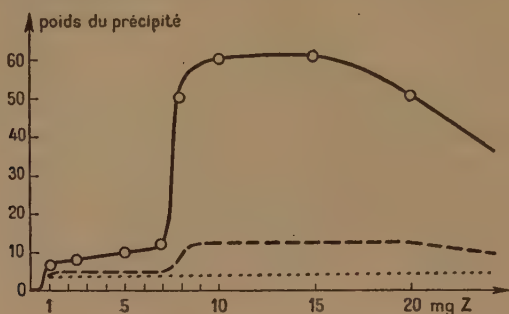


Fig. 9. — Poids du précipité (↓) obtenu à partir de 1 ml. de sérum en fonction de la dose de zéphirol.

(En pointillés les teneurs du précipité en lipides et en lipides + zéphirol : voir p. 51).

b) *Influence des sels minéraux.* — Les sels minéraux ont une influence sur la pente des courbes, sur la quantité de zéphirol nécessaire pour avoir une précipitation (commençante ou totale), sur la dissolution dans un excès de zéphirol (fig. 10). Nous avons tracé les courbes de précipitation à pH 8 ; nous avons amené 1 cm³ de sérum à une dilution finale de 5 cm³ par l'addition de solutions de chlorure de sodium de concentrations croissantes.

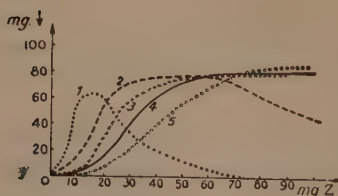


Fig. 10. — 5 quantités différentes de ClNa : 0-45 mg-90 mg-180 mg-900 mg.

Poids du précipité (↓) obtenu à partir de 1 ml. de sérum en fonction de la dose de zéphirol (Z) en présence de quantités variables de chlorure de sodium ajouté.

On ne peut pas tracer les courbes de précipitation du sérum total en l'absence totale de sels, car la dialyse du sérum élimine la fraction euglobulinique.

Voici une courbe de précipitation de sérum dialysé débarrassé de ses euglobulines. 1 cm³ (contenant 75 mg. de protéines), amené par de la soude *n*/10 à des pH croissants, additionné de 30 mg. de zéphirol.

Par comparaison avec la courbe 4, figure 7, nous concluons que les euglobulines faisaient partie des protéines précipitant aux pH 4,5 à 7.

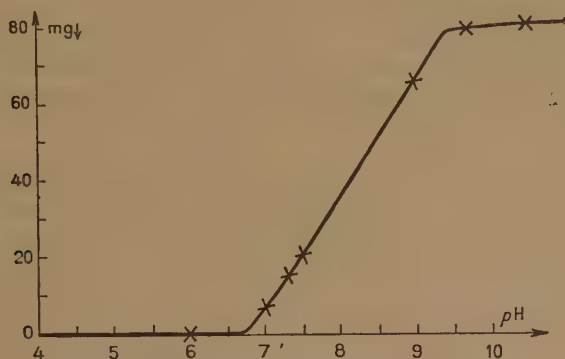


Fig. 11. — Précipité obtenu à partir de 1 ml. de sérum dialysé, privé de ses euglobulines, en présence de 30 mg. de zéphirol en fonction du pH.

c) *Influence de la nature du saponium.* — La nature du saponium a une influence notable sur les courbes de précipitation : alors que le désogène se comporte d'une façon très voisine du zéphirol, la sapamine MS s'en distingue par la faible quantité de protéines du sérum qu'elle précipite au voisinage de la neutralité. En milieu fortement alcalin, la sapamine précipite la totalité des protéines du sérum, comme les deux autres saponiums, tandis qu'à pH 8 par exemple, nous obtenons les résultats numériques suivants (à partir de 1 cm³ de sérum) ; les chiffres en milligrammes indiquent la quantité de saponium nécessaire à l'obtention du maximum de précipité, le poids de ce précipité au maximum de précipitation et le poids des protéines contenues dans ce précipité.

	Zéphirol	Désogène	Sapamine MS
Saponium	10 à 12	11 à 14	18 à 25
Précipité (1)	60	66	30
Protéines.	47	52	23

(1) Le poids de précipité correspond à l'ensemble protéines + lipides + saponium précipité.

On peut caractériser les saponiums par plusieurs données numériques : dose minimale donnant un précipité avec le sérum (premier petit précipité), dose minimale donnant un abondant précipité (deuxième précipitation), dose donnant le maximum de précipité, dose maximale au-dessus de laquelle le sérum ne précipite plus ; nous pouvons désigner ces quatre doses par les lettres *m*, *n*, *p*, *q*.

Comparons les chiffres obtenus avec les trois saponiums (en mg.) sur 1 cm³ de sérum de cheval.

En mg.	Zéphirol	Désogène	Sapamine MS
<i>m</i>	0,40	0,24	0,65
<i>n</i>	7	8	12
<i>p</i>	10	11	18
<i>q</i>	50	65	75

La comparaison est facilitée si nous affectons chaque activité d'un coefficient proportionnel, comme nous l'avons fait page 12 en attribuant au zéphirol la valeur 100.

	Zéphirol	Désogène	Sapamine MS
Poids moléculaire. . .	100	135	150
<i>m</i>	100	60	160
<i>n</i>	100	114	170
<i>p</i>	100	110	180
<i>q</i>	100	130	150

Alors que les trois dernières activités se correspondent à peu près de façon équimoléculaire, la première (*m*) montre une anomalie pour le désogène. Nous verrons plus loin que dans l'action des saponiums sur les lipides et les cénapses lipidiques, les coefficients présentent cette même singularité. Nous en concluons que les lipides jouent un rôle dans le point de début de précipitation du sérum (*m*). Nous confirmerons ceci au chapitre III.

Nous allons voir qu'un cinquième nombre peut encore servir à caractériser et à comparer les divers saponiums dans leur action sur les protéines.

d) *Précipitation en milieu dilué.* — Nous avons jusqu'ici admis que la précipitation des protéines par les saponiums ne dépendait pas de la dilution, puisqu'il s'agit d'un complexe stœchiométrique insoluble (Nous avons simplement constaté que la précipitation des

euglobulines pouvait interférer avec ces résultats, du fait que le sérum est un milieu riche en sels minéraux). Cependant, le sérum dilué, au lieu de précipiter immédiatement avec le zéphirool, se trouble, et le précipité n'apparaît que plus tardivement. La réaction ressemble alors à la *floculation d'un anticorps par un antigène*. On y retrouve la *zone de flocculation*, le complexe étant soluble dans un excès de protéines ou de réactif : le saponium se comporte comme un antigène non spécifique vis-à-vis de la protéine qui se comporte comme un anticorps non spécifique. Cette analogie peut nous aider à comprendre le mécanisme de la précipitation des antigènes et des anticorps. La méthode de Ramon (348) peut être appliquée à la réaction protéines-saponium : elle consiste à faire une gamme de tubes contenant des quantités variables de saponium et une quantité fixe de protéines et à mesurer le temps au bout duquel apparaît le précipité. Le tube qui floccule le premier correspond à une neutralisation réciproque optimale des deux corps.

Les doses optimales de saponium (qu'on peut désigner par la lettre *r*) nous montrent, par la méthode de comparaison déjà utilisée plus haut, que cette activité des saponiums se rapproche de l'action sur les lipides (comme pour les doses *m*).

	Zéphirool	Désogène	Sapamine MS
<i>r</i>	100	55	170

On connaît l'importance des lipides dans les réactions de flocculation antigène-anticorps (142, 158); l'optimum de flocculation serait donc ici aussi en liaison avec la teneur du sérum en lipides. Et la dose correspondante ne serait pas identique à la dose de combinaison stœchiométrique avec les protéines.

Avant de pouvoir interpréter l'action des saponiums sur le sérum total, nous devons examiner l'action sur des fractions isolables du sérum. Nous avons vu l'action sur la sérumalbumine; étudions maintenant le comportement des globulines γ .

2. PRÉCIPITATION DES GLOBULINES γ . — Les globulines γ ont été préparées par précipitation du sérum par le sulfate d'ammonium à 34 o/o de saturation (technique de Cohn). Le précipité est dissous dans de l'eau physiologique et dialysé contre l'eau physiologique (ClNa à 0,9 o/o dans l'eau bidistillée) jusqu'à disparition du sulfate d'ammonium.

La solution utilisée contenait 98 mg. de globulines par centimètre cube. Nous avons opéré de la même façon que pour le sérum total (le

témoin sans zéphirol donne une précipitation de 20 mg. de globulines (euglobulines) dans les conditions décrites à pH 6,7).

En fonction de la quantité de zéphirol à pH constant, la précipitation se produit à peu près comme dans le cas du sérum total (fig. 12). La comparaison des courbes des fig. 12 et 6 ne nous montre que peu de différences essentielles. Notons cependant les points suivants :

1° La précipitation est plus abondante dès les très petites quantités

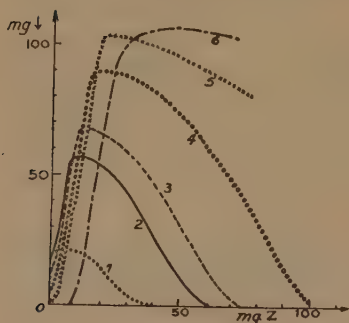


Fig. 12. — 6 pH différents :
4,7 6,0-8,7-9,3-9,6-10,5.

Précipitation des globulines- γ . Poids du précipité ($\downarrow$) (à partir de 98 mg.) en fonction de la dose de zéphirol (z).

de zéphirol : ceci est dû à la richesse en *euglobulines*, comme le montrent les courbes de précipitation d'un sérum privé de ses euglobulines par dialyse. En fait, nous constatons que la présence de zéphirol en petite quantité s'oppose partiellement à la précipitation par simple dilution des euglobulines.

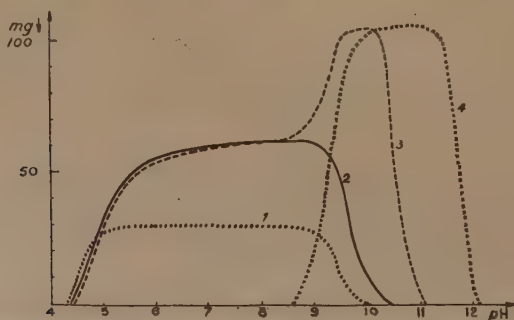


Fig. 13. — 4 quantités différentes de zéphirol : 5 mg.-10 mg.-20 mg.-70 mg.

Précipitation des globulines- γ (98 mg.) en fonction du pH par des doses constantes de zéphirol.

2° La précipitation est à peu près totale pour une quantité de zéphirol assez nettement plus petite.

En fonction du pH les courbes (fig. 13) ressemblent, elles aussi, à

celles de la figure 7. Nous constatons aussi la présence d'un palier que la courbe 14 (maximum de précipitation en fonction du pH (enveloppe des courbes 13)) marque manifestement.

La précipitation débute vers pH 4,3. Le palier qui va de pH 5,7 à pH 8,5 environ semble correspondre à la précipitation de la moitié des globulines γ . Cette fraction précipite de façon progressive avec la quantité de zéphirol ajoutée, et le précipité est alors proportionnel à la quantité de zéphirol ajoutée. La seconde fraction ne précipite qu'au-dessus de pH 8,5 et pour une teneur en zéphirol dépassant 10 mg. pour 100 mg. de globulines. Cette seconde fraction rappelle le comportement de la sérumalbumine.

La première fraction se redissout facilement dans un excès de zéphirol. Etant donné le pH élevé, la seconde fraction est plus difficile à remettre en solution.

Nous concluons de ces expériences que vis-à-vis de la précipitation par le zéphirol, les globulines γ , simplement séparées par le sulfate d'ammonium à 34 o/o de saturation, sont hétérogènes.

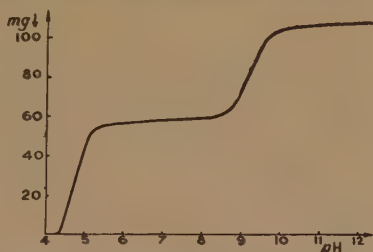


Fig. 14. — Maximum de précipitation en fonction du pH.

3. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS. COMPORTEMENT DU SÉRUM SANGUIN

— Lorsque nous opérons sur les globulines totales (précipitées à 51 o/o de saturation en $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$), nous retrouvons des courbes analogues à celles que nous venons de tracer pour les globulines γ . Ici encore, une première fraction précipite dès pH 4,5 et représente près de la moitié des globulines. La seconde fraction ne précipite qu'au-dessus de pH 8-8,5.

Dans la fraction du sérum non précipitée à 51 o/o de saturation en $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (albumines totales), il y a également une fraction qui précipite par le zéphirol au-dessous de pH 7. Lorsqu'enfin on cristallise plusieurs fois la sérumalbumine, nous avons vu qu'elle précipite alors de façon à peu près homogène au-dessus de pH 7,7.

Nous retrouvons approximativement les courbes de précipitation du sérum total en additionnant les diverses courbes de précipitation dans les mêmes conditions.

Le sérum paraît donc contenir principalement deux sortes de protéines : l'une, à la façon de la sérumalbumine, ne précipite que pour des pH supérieurs à 7-8, et à partir d'une teneur en zéphirol voisine de 0,4 molécule-mg. par gramme de protéine. L'autre, à la façon des euglobulines, précipite à partir de pH 4,4, proportionnellement à la

teneur en saponium. Les deux fractions se dissolvent dans un excès de zéphirol.

Nous avons cherché à préciser leur nature par une identification électrophorétique. Nous avons opéré à pH 7,38 (à ce pH la cristalalbumine n'est pas précipitée par l'addition de zéphirol). Le sérum-témoin est dialysé contre le tampon phosphaté $M/15$, puis dilué au $1/4$ par ce même tampon. L'échantillon où nous avons ajouté 11,2 mg. de zéphirol par centimètre cube a donné un précipité que nous avons écarté. Nous avons ainsi séparé les protéines précipitables à pH 7,38 des autres : ces dernières sont dialysées dans les mêmes conditions que le témoin.

Les courbes électrophorétiques ⁽¹⁾ (obtenues après 5 000 secondes dans un gradient de potentiel de 5 v./cm.) nous donnent les résultats suivants exprimés o/o de protéines totales du sérum (fig. 15).

	Témoin	Fraction non précipitée par le zéphirol
Albumines	38	30
Globulines α	11	2,5
» β	16	
» γ	33	21,5
Total.	98	54

Les protéines précipitées représentent donc 20 o/o de la fraction albuminique, 90 o/o des globulines α et β , et 35 o/o des globulines γ .

1° Ce sont les globulines α et β qui sont les fractions les plus précipitables.

2° Puisqu'une fraction albuminique importante précipite, on peut penser que l'albumine, bien qu'homogène à l'électrophorèse, contient une fraction distincte de la cristalalbumine. Ceci est en accord avec nos expériences de précipitation sur les albumines totales séparées à 51 o/o de saturation en $SO_4(NH_4)_2$.

3° Les globulines γ électrophorétiques sont hétérogènes comme les globulines γ isolées à 34 o/o de saturation en $SO_4(NH_4)_2$.

Nous verrons que le problème de la précipitation des protéines du sérum par les saponiums dépasse le simple cadre des protéines (voir p. 50, les recherches sur les *cénapses lipidoprotéidiques*).

Nous avons également cherché à quelle fraction électrophorétique

(1) Les électrophorèses ont été effectuées dans le laboratoire de M. Audubert par M. de Mende. Nous sommes heureux de pouvoir les remercier ici très vivement.

on pouvait rattacher la première fraction précipitée dès les très petites doses de zéphirol : les diagrammes électrophorétiques, obtenus soit sur du sérum de cheval, soit sur du sérum humain, nous montrent dans ces deux cas une modification portant sur les globulines β et α . Nous avons traité le sérum par du zéphirol (1,2 mg. et 4 mg. par cm^3 de sérum) et filtré le précipité obtenu après 6 heures de repos. Les électrophorèses furent effectuées dans les conditions précédentes (sérum dilué au 1/4, pH 7,38) (fig. 16).

Sans qu'on puisse exactement chiffrer la quantité de globulines α

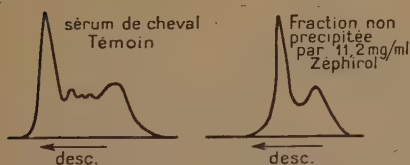


Fig. 15.

Fig. 15. — Sérum de cheval.

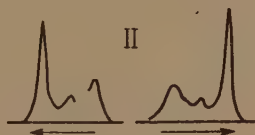
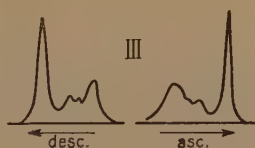


Fig. 16. — Sérum humain :

I. Témoin (sans zéphirol).

II. Fraction non précipitée par 1,2 mg. zéphirol/ml.

III. Fraction non précipitée par 4 mg. zéphirol/ml.

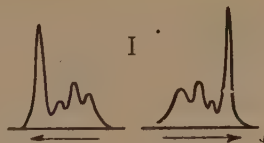


Fig. 16.

ou β manquante, on note que les très petites doses de zéphirol (1,2 mg.) affectent d'abord et surtout la zone des GLOBULINES β (dont on connaît la forte teneur en lipides) (voir chap. III, p. 51) : on voyait même une légère opacification de la solution (due à une floculation difficile à expliquer), au voisinage de la frontière de queue des globulines β dans le cas du sérum humain, plus riche en globulines β . Les doses un peu plus fortes de zéphirol (4 mg.) touchent ensuite les GLOBULINES α . C'est pour des doses nettement plus fortes (10 mg. et plus) qu'un précipité important entraîne le reste des globulines α et β , une partie des globulines γ et des albumines.

Les saponiums réalisent donc une séparation des protéines, mais en catégories qui ne se superposent pas aux catégories antérieurement décrites. Sur des diagrammes tridimensionnels (poids du précipité, dose de saponium, pH), on observe l'existence de 3 paliers

correspondant à 3 fractions protéiques dont nous avons vu les domaines de précipitation :

La première (5 à 10 o/o des protéides du sérum), très riche en lipides, correspond à une partie des globulines β et α .

La seconde (40 o/o des protéides du sérum) comprend le reste des globulines β et α , 35 o/o des globulines γ et 20 o/o des albumines.

La troisième (le reste des protéides sériques) renferme en particulier la cristalbumine et des pseudoglobulines γ .

3. — PROPRIÉTÉS DES COMPLEXES PROTÉINES-SAPONIUMS

A propos de la nature des composés formés entre protéines et saponiums (nous avons déjà abordé la question page 14), nous pouvons déjà faire les remarques suivantes : l'importance du pH dans la précipitation des protéines et le fait que protéines et saponiums sont inversement ionisés, rendent probable l'hypothèse de liaisons salines. Mais (malgré l'étroitesse du sens du mot complexe pour les chimistes) nous reconnaissons aux composés protéine-saponium quelques propriétés des *complexes imparfaits* : en effet les composés paraissent stœchiométriques et chaque composant se trouve partiellement masqué à ses réactifs habituels : le pouvoir hémolytique des saponiums est fortement diminué (voir p. 69) et la protéine ne précipite plus avec les cations lourds comme le cuivre à un pH inférieur au pH limite de précipitation avec le saponium. Le rôle des chaînes hydrophobes nous indique qu'à côté des liaisons salines, il existe sans doute des liaisons par forces de Van der Waals. Aussi le terme de complexe peut-il être avantageusement remplacé par celui de *cénapse* déjà consacré par l'usage pour les liaisons lipide-protéine.

1° SOLUBILITÉ DES CÉNAPSES PROTÉINES-SAPONIUMS. — L'étude de la précipitation des cénapses protéines-saponiums en milieu aqueux nous a montré l'existence d'un composé stœchiométrique insoluble dans un domaine de pH supérieur au pH isoélectrique. La composition de cette cénapse varie avec la quantité de sels minéraux présents (et avec le pH). Elle dépend également de la nature du saponium et de celle de la protéine. Le précipité d'albumine-zéphirool est très visqueux : il s'enroule sur l'agitateur à la manière des associations nucléoprotidiques. Il colle aux parois du verre. Il est plus ou moins hydraté, selon le pH : à pH voisin de 8, il se rassemble même en une phase liquide translucide jaune plus dense que la phase aqueuse : il s'agit d'un coacervat comme ceux qui ont été déjà vus par Mlle Magnant et Dervichian (70).

Les domaines de solubilité de ces complexes dans l'eau ont été décrits pour la sérumalbumine et les protéines du sérum. Ces

domaines sont profondément modifiés par les sels minéraux : la figure 4 nous en donne un exemple net.

Notons que la combinaison de 110 mg. d'albumine avec 16 ou 17 mg. de zéphirol, combinaison insoluble dans l'eau, mais soluble dans les solutions salines (fig. 4), réalise un modèle d'euglobulines. De même la combinaison de 110 mg. d'albumine avec 30 à 35 mg. de zéphirol, insoluble pour des concentrations salines moyennes mais soluble dans les solutions salines concentrées et dans l'eau pure, rappelle le comportement des nucléoprotéides.

Les cénapses saponio-protéidiques insolubles dans l'eau, lorsqu'elles sont isolées, sont solubles dans certains solvants organiques, en particulier dans l'alcool.

2° STABILITÉ DES CÉNAPSES PROTÉINES-SAPONIUMS. — Nous avons cherché à séparer la protéine du saponium après la précipitation de la cénapse : le problème était intéressant pour l'application des savons cationiques à l'étude des protéines, dans les cas où on a besoin de retrouver la protéine intacte. Malheureusement, après dissociation de la cénapse par l'alcool et l'éther à -15°C . (technique de délipidation de Hardy et Gardiner-Hewitt (137, 151)), la protéine est restée partiellement insoluble dans l'eau : le saponium a dénaturé la protéine. Par simple extraction à l'éther de la cénapse remise en solution aqueuse alcaline, il est impossible de séparer le saponium.

Nous n'avons donc encore aucune méthode de dissociation capable de régénérer la fraction protéinique intacte.

La présence du saponium accroît considérablement la stabilité de la protéine à la chaleur : on peut amener à l'ébullition, sans coagulation, une solution d'albumine à pH 6 ou 7 (inférieur à 7,7) contenant 0,8 g. de zéphirol par gramme d'albumine.

3° INFLUENCE DU SAPONIUM SUR LE pH DE LA SOLUTION DE PROTÉINE. — On sait que l'introduction d'un sel minéral, capable d'entrer dans un complexe avec les protéines, modifie le pH d'une solution de protéine : ainsi l'addition de sulfate de cuivre à une solution d'albumine abaisse le pH autant qu'une quantité équimoléculaire d'acide sulfurique (269, 270). Puisque le cation saponium se fixe sur la protéine, il est logique de penser que le sel de saponium agit comme le sel de cuivre.

En effet, après addition du saponium, le pH de la solution protéique diminue, mais seulement légèrement. Le pH continue à diminuer lentement pendant quelques heures. Cette modification du pH est beaucoup plus nette au-dessus du pH critique de précipitation qu'au-dessous. Mais l'acidification est bien plus faible que celle qu'on aurait eu avec une quantité équimoléculaire d'acide (six fois moins en milieu alcalin). L'action du saponium est donc différente de celle des sels minéraux dont les cations forment des complexes avec la protéine.

Voici les courbes obtenues avec la sérumalbumine cristallisée iso-

électrique et avec le sérum sanguin. Nous avons mis en abscisses la quantité de soude $n/10$ ou d'acide chlorhydrique $n/10$ ajoutée à 2 cm^3 de solution protéique, et en ordonnées le pH de la solution avant et aussitôt après addition de zéphirol. A 2 cm^3 de solution d'albumine à 5,8 o/o nous avons ajouté 2 cm^3 de solution de zéphirol à 1 o/o (soit environ 0,06 mol.-mg.). A 2 cm^3 de sérum nous avons ajouté 11 cm^3 de solution de zéphirol contenant $1/6$ mol.-mg. de zéphirol (soit environ 57 mg.).

L'abaissement du pH est relativement important dans la zone où le précipité se forme. Aussi faut-il tenir compte de cette variation possible dans les résultats précédemment exposés. Nous avons toujours

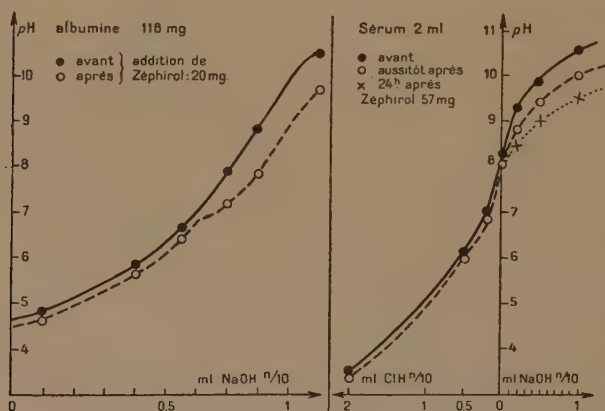


Fig. 17. — pH des solutions protéiques avant et après addition de zéphirol.

estimé le pH avant l'addition de zéphirol. (La forme des courbes ne serait guère différente avec les pH estimés après). Cette modification du pH , prolongée dans le temps, semble indiquer une dénaturation de la protéine.

Si la modification du pH est un indice de la formation du complexe protéine-saponium, nous devons conclure que le complexe n'existe nettement qu'au-dessus du pH isoélectrique, ou plutôt du pH « critique » de précipitation de la solution protéique dans les conditions de salinité données.

Le sérum dialysé contre l'eau bidistillée présente une modification du pH plus importante que le sérum.

L'abaissement de pH varie avec la quantité de saponium et atteint un palier pour une teneur correspondant à l'optimum de précipita-

tion : par exemple 2 cm³ d'albumine (118 mg.) + 1 cm³ NaOH *n*/20 sont additionnés de solution de zéphirol (Z) :

Z en mg. . . .	0	3	5	10	15	20	25
pH	10,5	10,5	10,4	10,1	9,8	9,7	9,65

4° TENSION SUPERFICIELLE DES MÉLANGES PROTÉINES-SAPONIUMS. — Les saponiums sont fortement tensioactifs. La mesure de la tension superficielle peut nous apporter d'utiles renseignements sur les associations possibles des saponiums avec les protéines ⁽¹⁾.

L'étude de la tension superficielle des solutions de savons et de protéines (Lecomte du Nouy, Dognon, Gougerot (74, 127, 225, 226, 227, 228) est rendue délicate par l'existence de trois phénomènes, qui la font varier au cours du temps, et qui ont été décrits sous les noms de phénomène de Gibbs, faux phénomène de Lecomte du Nouy, et phénomène de Lecomte du Nouy.

Nous avons retrouvé ces trois phénomènes dans l'étude des mélanges de saponiums et de protéines : pour cela nous avons utilisé l'appareil de Dognon et Abrihat ⁽²⁾ ; cet appareil permet de suivre en fonction du temps la tension superficielle statique du liquide placé dans une capsule de platine.

Mettons tout d'abord dans la capsule de l'eau pure (10 cm³). La tension superficielle est voisine de 74 dynes/cm. Ajoutons une goutte de solution de zéphirol à 1 o/o (soit 200 µg.) à la surface de l'eau et suivons la tension superficielle TS en fonction du temps (en minutes) :

Temps.	1/2	1	2	3	5	7	10	12	14	16	20	20
TS . . .	39	37	36	37,3	38,4	39,7	41,2	42,3	43	43,8	44,6	44,6

Cette remontée correspond à la dissolution en profondeur. Elle est assez forte si on la compare à celle de l'oléate de sodium (74). Elle correspond au faux phénomène de du Nouy.

(1) La méthode a déjà été utilisée, fréquemment pour mettre en évidence les combinaisons entre savons anioniques et protéines (72, 359, 360, 361, 369, 370) ou entre sels biliaires et protéines (25, 275, 403).

(2) Toutes ces expériences ont été effectuées dans le laboratoire de M. le Professeur A. Dognon. Nous remercions très chaleureusement MM. Dognon et Gougerot de l'extrême amabilité avec laquelle ils nous ont accueilli, guidé et aidé.

Pour mettre en évidence le phénomène de Gibbs, il suffit de bien agiter la solution, et de suivre de nouveau l'évolution de la tension superficielle. Etant donnée la dose (très grande par rapport à la surface du liquide) de zéphirol que nous avons introduite, la surface retrouve rapidement sa saturation et le phénomène est peu marqué. Les courbes ci-jointes (fig. 18) montrent ainsi les deux phénomènes avec une goutte de zéphirol à 1 o/o, puis avec une seconde goutte, puis avec une troisième.

Nous pouvons comparer ces résultats avec ceux qu'on obtient en remplaçant l'eau pure par une solution de protéines : du sérum, par exemple (10 cm³). Le sérum donne à lui seul un phénomène de Gibbs

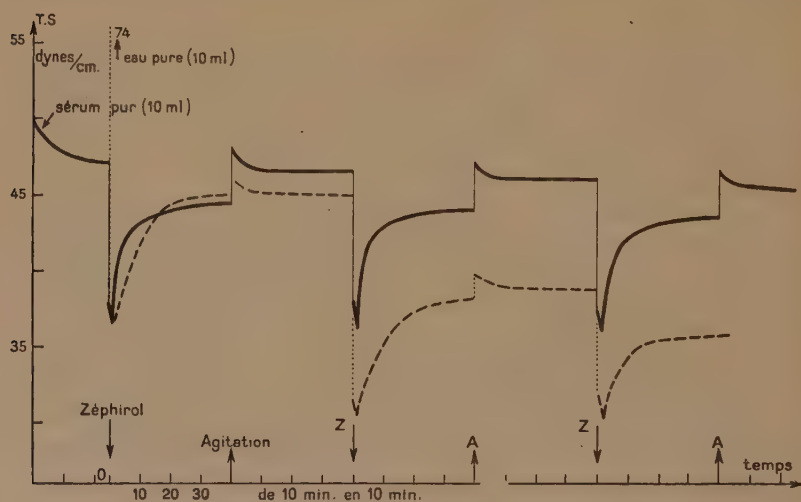


Fig. 18. — Tension superficielle en fonction du temps :

3 additions de 1 goutte de zéphirol à 1 o/o à l'eau pure (en tirets) et au sérum (en trait plein).

très marqué et très lent. Initialement à 50 dynes/cm., la tension superficielle s'abaisse à 47,5 au bout de 15 minutes et continue à diminuer lentement : après 24 heures, elle est voisine de 45. L'addition en surface d'une goutte de solution de zéphirol à 1 o/o (200 µg.) abaisse instantanément la tension superficielle comme sur l'eau pure. Puis la tension remonte par suite de la dissolution en profondeur. Ici nous avons non seulement le faux phénomène de du Nouy, mais peut-être aussi le vrai par adsorption du saponium sur les protéines. Sur la première goutte de zéphirol ajoutée, nous remarquons que la remontée est plus rapide qu'en l'absence de protéines. Le phénomène de Gibbs, recherché comme précédemment par agitation de la solu-

tion, est plus important qu'avec l'eau pure. On peut donc déjà conclure à l'existence du vrai phénomène de du Nouy, c'est-à-dire à la formation d'une cénapse saponio-protéidique.

Les gouttes suivantes apportent une confirmation de ce phénomène : en effet, la tension superficielle finale est plus haute en présence de sérum. La couche superficielle n'est donc pas saturée en saponium, même pour une dose assez importante de zéphirol (15 mg.). C'est donc probablement une cénapse saponio-protéidique qui s'étale en surface, et qui stabilise la tension superficielle à une valeur voisine de 32 dynes/cm. (saponium sans protéines 26 dynes/cm.).

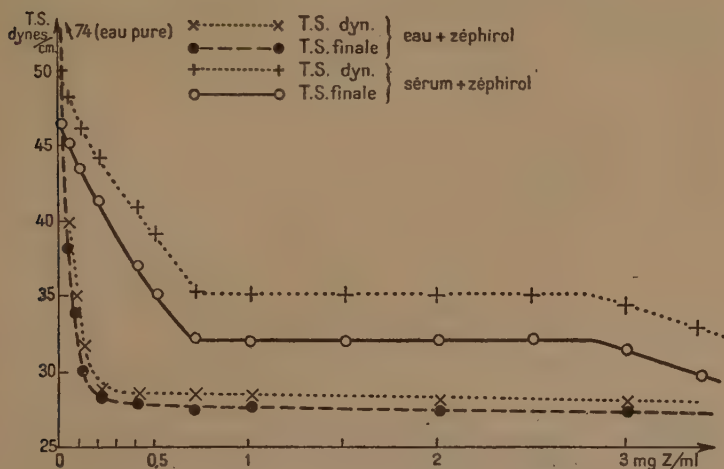


Fig. 19. — Tension superficielle (statique et dynamique) des mélanges sérum + zéphirol et eau + zéphirol.

La tension superficielle finale, vers laquelle tendent asymptotiquement les solutions (inférieurement si la solution n'a pas été agitée, supérieurement si elle a été agitée), caractérise l'équilibre de la loi de Gibbs entre la solubilité profonde et la solubilité superficielle, ainsi qu'une orientation des molécules. La variation de cette tension superficielle en fonction de la dose de zéphirol ajoutée à 10 cm³ de liquide (eau ou sérum), montre graphiquement (fig. 19) l'existence de cette combinaison protéine-saponium. La tension superficielle dynamique (obtenue par compte-gouttes ou par arrachement) se rapproche de la valeur obtenue après agitation du mélange. Cette valeur, qui correspond à une concentration superficielle égale à la concentration profonde (les molécules superficielles non orientées), peut aussi caractériser un mélange donné de protéines et de saponium. Cette seconde courbe est beaucoup plus proche de la première

dans le cas de l'eau pure, le phénomène de Gibbs étant dans ce cas moins important.

Si au lieu d'ajouter le saponium au sérum, on suit l'ordre inverse, la courbe 20 obtenue complète la précédente pour les proportions importantes de saponium (zéphirol 2 mg. + sérum (0,1 cm³ à 4 cm³) + tampon boraté pH 7,8 (volume total 4 cm³)).

Ces courbes mettent en évidence les deux mêmes points singuliers que dans l'étude de la précipitation du sérum : au-dessus d'un point voisin de 6 ou 7 mg. de zéphirol/cm³ de sérum, la tension superficielle reste égale à celle du zéphirol seul. Elle monte ensuite et reste constante de 3 mg. à 0,7 mg., la zone comprise entre 0,7 mg. et 7 mg. de zéphirol/cm³ de sérum correspond à la précipitation de la cénapse riche en lipides. Ceci nous paraît confirmer l'hypothèse d'une

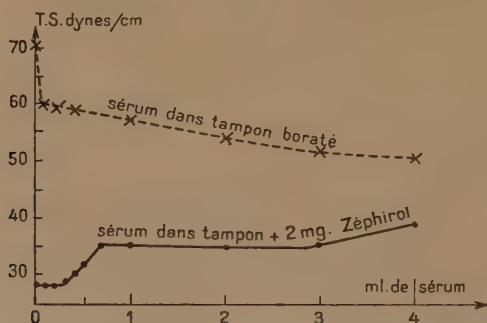


Fig. 20. — Tension superficielle dynamique des mélanges zéphirol-sérum et eau-sérum.

combinaison sous forme de *cénapse saponio-protéidique* dont la tension superficielle serait intermédiaire entre celle du saponium et celle des protéides.

L'extraction par l'éther (qui élimine une importante fraction lipidique, en particulier tout le cholestérol, voir p. 45) ne modifie pas la tension superficielle dans cette zone.

5° ELECTROPHORÈSE. — Nous avons utilisé l'électrophorèse pour préciser l'existence de complexes protéines-saponium et la nature des liaisons mises en jeu.

Des expériences qualitatives ont été effectuées avec l'appareil de Machebœuf et Monnier (260), qui permet des mesures de longue durée. Des diagrammes quantitatifs ont été obtenus grâce à l'appareil de Tiselius (1).

(1) Nous devons ces diagrammes à l'amabilité de M. de Mende (laboratoire de M. Audubert).

Nous avons opéré tantôt sur la sérumalbumine cristallisée (solutions dialysées contre le tampon phosphaté M/15 à pH 7,38, amenées à 8 mg. par cm³), tantôt sur le sérum total ou fractionné par le zéphirol.

Notons que toutes les mesures ont été faites à un pH supérieur au pH isoélectrique.

En aucun cas nous n'avons constaté de modification de la mobilité électrophorétique d'une fraction protéique en présence de zéphirol : lorsque le zéphirol est en excès, il apparaît une frontière migrant en sens inverse des protéines. Lorsqu'il est en très petite quantité, il migre avec les protéines sans en modifier la mobilité et on ne décele pas trace de saponium (par l'acide trichloracétique) hors des zones contenant des protéines. Avec de très grandes quantités de saponium (ayant remis en solution les protéines précipitées), on observe une précipitation au sein de l'appareil à électrophorèse.

Ces résultats permettent quelques conclusions nettes : 1° Les petites quantités de saponium entrent dans la formation d'un complexe (ou d'une cénapse) indissociable par l'électrophorèse. 2° Les quantités plus importantes sont aisément dissociables (*liaison saline*). 3° Les molécules de saponium, fixées sur la protéine, n'en modifient pas la mobilité électrophorétique.

Les électrophorèses de sérum total et de fractions de sérum nous ont permis, comme nous l'avons déjà vu pages 24 et 25, de préciser l'action des saponiums sur le sérum.

6° **POUVOIR ROTATOIRE.** — Le pouvoir rotatoire de la sérumalbumine cristallisée ne varie pas avec l'addition de zéphirol à pH 6,5. Comme dans le cas précédent, nous constatons que le saponium ne modifie pas la protéine (du moins dans les conditions de pH où nous avons opéré) :

A 20 cm³ de solution d'albumine à 3,70 o/o, nous ajoutons une solution de zéphirol à 25 o/o. Les lectures (raie verte du mercure) n'ont été possibles qu'au-dessous de 0,4 cm³ de zéphirol et au-dessus de 1,7 cm³. Entre ces deux doses, la solution bien que limpide diffuse la lumière et se montre presque opaque au polarimètre (phénomène de Tyndall). Cette opacité témoigne d'une *association des molécules* sous l'influence du zéphirol.

Z (en mg. par mg d'albumine) . . .	0	0,135	0,27	0,61	0,95
α (pour 740 mg.) . .	— 6°20	— 6°10	illisible	— 5°62	— 5°44
$[\alpha]_{\frac{18}{5400 \text{ Å}}}^{\frac{18}{5400 \text{ Å}}}$	— 84°	— 84°		— 83°	— 84°

7° VISCOSITÉ ET PRESSION OSMOTIQUE. — La viscosité du sérum n'a présenté aucune modification par addition de sapamine MS jusqu'à une concentration de 2,5 mg./cm³ de sérum (début de précipitation): les mesures ont été faites dans un appareil à bille.

Sapamine en mg./cm ³ de sérum.	0	0,04	0,4	2,5
Temps de chute de la bille en secondes	57,6	57,6	57,6	57,6

Ces résultats sont en accord avec ceux qu'ont obtenus Neurath et Putnam (303) avec les détergents anioniques.

Les quantités de saponium mises en jeu étaient trop faibles pour provoquer des variations appréciables de la viscosité. Cependant des mesures de pression osmotique nous ont montré que des doses analogues provoquent des modifications importantes dans la grandeur moléculaire; et il est donc assez surprenant de ne pas noter la moindre différence de viscosité dans l'expérience précédente.

Les mesures osmométriques ont été effectuées dans des sacs de collodion ou de viscose, la pression étant mesurée, après 48 heures à 72 heures d'équilibre, par un manomètre à eau. Le tube contenant la solution était en équilibre avec une solution salée à 9 o/oo.

Le sérum pur avait une pression osmotique de 35 cm d'eau. Après addition de 2 mg. de sapamine MS par centimètre cube de sérum, nous avons obtenu une pression de 21 cm. d'eau. En ajoutant encore de la sapamine, nous avons obtenu des pressions encore plus faibles. Cet abaissement rapide de la pression osmotique nous prouve la formation d'associations moléculaires.

Outre l'intérêt de nous confirmer l'action des saponiums sur les protéines, ces résultats apportent des éléments nouveaux concernant la régulation osmotique du milieu intérieur: il est en effet possible que des détergents naturels (phosphatides, savons, sels biliaires, etc.) aient *in vivo* une action analogue sur les protéines. Nous appuyons ici une hypothèse, formulée en 1931 par M. Machebœuf, concernant l'influence de dérivés lipidiques sur la pression osmotique du sérum (259).

4. — CONCLUSIONS

1. *Cénapses saponio-protéidiques et mode d'action des saponiums sur les protéines.* — Un certain nombre d'observations nous conduisent à affirmer l'existence de complexes ou plutôt de cénapses saponium-protéine: l'étude de la précipitation des protéines, qui diffère d'une précipitation par liaison purement saline; l'étude de la pression osmotique qui nous montre que les protéines (quoique non pré-

cipitées) s'associent en édifices plus gros ; l'opacification des solutions d'albumine ; l'entraînement électrophorétique des petites quantités de saponium ; l'étude de la tension superficielle des mélanges de protéines et de saponium ; l'étude du pouvoir antilytique des protéines (voir p. 69) ; la stabilité des associations saponium-protéine vis-à-vis des solvants ; l'abaissement du pH des solutions protéiques. etc. D'autres expériences nous montrent au contraire que ces associations protéine-saponium, lorsqu'elles ne sont pas précipitées, ont des propriétés physiques identiques à la protéine seule (pouvoir rotatoire, mobilité électrophorétique).

Nous avons déjà proposé p. 14 une hypothèse sur l'action des saponiums sur les protéines. L'étude physique que nous venons de faire nous permet peut-être de la préciser.

Les liaisons salines (cf. électrophorèse) jouant un rôle important, c'est vraisemblablement sur les radicaux anioniques de la protéine que se fixe le cation saponium. Les chaînes hydrophobes du saponium s'associent à d'autres molécules de saponium provoquant ainsi des associations entre molécules de protéines (cf. pression osmotique, précipitation, etc.). Les molécules (ou micelles) de saponium se trouvent ainsi entourées par les molécules protéiniques : ce qui explique qu'elles sont masquées (cf. hémolyse, électrophorèse, tension superficielle) et qu'elles ne modifient pas les propriétés électriques ou optiques des protéines.

A partir d'une certaine grosseur d'associations moléculaires, la cénapse est capable de précipiter.

Pour une dose plus forte de saponium, les molécules de saponium, s'insinuant entre les chaînes hydrophobes ⁽¹⁾, provoquent des déformations dans les molécules protéiniques, faisant apparaître des faces hydrophobes de la protéine : ces faces seaturent de molécules de saponium, liées par des forces de Van der Waals : le saponium en excès devient un facteur solubilisant et stabilisant pour les molécules protéiniques, ainsi ouvertes et déformées (et sans doute dénaturées (38)) ⁽²⁾.

En fait, comme l'ont montré D. Dervichian et C. Magnant (70), ces cénapses saponio-protéiniques forment des coacervats : l'étude de la précipitation de ces cénapses est en fait celle de la démixtion du coacervat. Il s'agit d'une phase contenant protéine, saponium, eau, sels minéraux, et l'addition progressive de saponium gonfle ces cénapses ou ces coacervats comme les hématies (voir p. 70).

Toutes nos conclusions précédentes s'appliquent au domaine de pH

⁽¹⁾ Ceci s'accorde avec la théorie de Lundgren (236) qui a repris une hypothèse déjà proposée depuis longtemps par M. Machebœuf (263).

⁽²⁾ Ceci s'accorde avec les résultats de K. J. Palmer (308).

supérieur au pH isoélectrique. Dans l'autre zone de pH les associations moléculaires saponium-protéine ne précipitent pas. Les études faites sur les détergents anioniques dans la zone de pH supérieure au pH_i ont montré que des associations moléculaires correspondaient aux complexes précipitables dans l'autre zone de pH (Putnam et Neurath (339), Pankhurst (312)). Mais lorsqu'on cherche à préciser les proportions stœchiométriques entre protéine et détergent, on constate des divergences importantes selon le test physique utilisé (diffusion (303), biréfringence d'écoulement (237), association en couche monomoléculaire (36, 37), électrophorèse (340), sédimentation (288, 301, etc.)) ou selon le détergent (340 et 238 et 15). Dans cette zone de pH les protéines possèdent encore une faible ionisation inverse, ce qui laisse la possibilité de liaisons ioniques entre protéine et détergent (336, 340, 371). Mais il nous paraît plus probable que les forces de Van der Waals sont alors les plus importantes : en effet la mobilité électrophorétique des complexes ainsi obtenus diffère de celle de la protéine seule ; la liaison entre détergent et protéine est donc plus forte qu'une liaison saline comme celle que nous avons observée dans l'autre domaine de pH .

2. *Autres réactions de précipitation.* — Les ACIDES NUCLÉIQUES précipitent avec les saponiums. Les nucléotides eux-mêmes donnent des complexes plus ou moins solubles. Les associations entre acides nucléiques et protéines basiques (protamines, histones) (22, 235, 291, 290) rappellent par leur comportement les associations protéine-détergent (voir p. 73).

Les gommés précipitent comme les protéines.

Les résultats de notre étude sur les liaisons entre protéines et amines quaternaires à chaîne grasse trouvent une application dans l'étude plus générale des interactions entre les protéines et les bases organiques (189). Nous croyons en particulier que les *cénapses lécithine-protéine* répondent à ce type (¹). La solubilité des mélanges de protéines de pH_i différents suit également les mêmes lois.

Les réactions entre *antigène et anticorps* rappellent aussi le même mécanisme : zone de précipitation (284, 315, 348), influence des sels minéraux (148, 276, 277, 393) et des lipides (142, 158).

Dans les cas où les deux constituants sont amphotères, c'est entre les 2 pH isoélectriques qu'on observe l'existence de *cénapses précipitables*. L'influence des sels minéraux, du pH ou de l'excès de l'un des constituants est toujours analogue à celle que nous avons étudiée sur le système plus simple : saponium-protéine.

3. *Applications pratiques.* — Les applications pratiques de l'étude des saponiums sur les protéines sont multiples.

(¹) Références (102, 115, 136, 155, 233, 281). Les *cénapses céphaline-protéine basique* correspondent au type inverse (41, 43).

Les saponiums peuvent servir à *doser les protéines* : à condition de se placer dans des conditions très précises de concentration, de pH, de salinité, on peut doser les protéines par précipitation suivie soit d'une pesée, soit d'un titrage néphélométrique. La méthode a été utilisée par Chinard (46) pour le dosage des protéines dans l'urine.

Les saponiums, comme les savons anioniques, peuvent servir à *mesurer le pH isoélectrique* d'une protéine (avec les réserves que nous avons faites, p. 13, voir une application p. 65). Méthode utilisée par Jaffe (177).

Les actions dénaturantes et précipitantes des saponiums sont mises à profit dans la *détoxification* (296, 297).

L'action solubilisante des détergents sur certaines protéines a déjà été appliquée à l'*extraction de protéines peu solubles des organes* : protéines de la peau (407) et des phanères (186). Nous avons cherché à rendre ainsi solubles les protéines du *cerveau* : alors que 30 o/o seulement des protéines du *cerveau* peuvent passer en solution aqueuse, l'addition de détergents (anioniques ou cationiques) permet d'obtenir en solution (ou en pseudo-solution) la presque totalité des protéines ; l'action solubilisante des saponiums sur les lipides permet de travailler sur des préparations non délipidées. Nous croyons donc que, dans ce domaine, les saponiums peuvent rendre de grands services pour l'étude des protéines ou des cénapses des organes. Nous avons également appliqué les propriétés des saponiums à la solubilisation de protéides de Ténia (voir p. 64).

La précipitation des protéines par les saponiums peut servir à *séparer* des protéines et à *isoler* certaines fractions protéiniques ou non (111).

Nous avons encore utilisé avec succès les saponiums pour la *préparation de l'hémoglobine cristallisée* (324).

Les saponiums nous ont enfin servi à l'isolement et à la purification de certains systèmes enzymatiques (voir p. 75 à 81).

II. — ACTION DES SAVONS A CATION ACTIF SUR LES LIPIDES

Les lipides forment parmi les éléments de la matière vivante une classe spéciale par leur solubilité dans les solvants organiques (éther, chloroforme) et leur insolubilité dans l'eau. A côté des lipides proprement dits (glycérides, stérides, phosphatides) on peut ranger les cérébrosides, les stérols et l'ensemble de l'insaponifiable (caroténoïdes, pigments divers) qui s'en rapprochent par leurs solubilités.

On a beaucoup travaillé et écrit sur les actions émulsionnantes, solubilisantes et détergentes des savons pour les molécules hydrophobes (J. W. McBain (240)). Nous verrons que les savons cationiques

sont de mauvais détergents : les lipides anioniques adsorbés ne sont pas déplacés de leur support, mais au contraire fixés par précipitation.

Le milieu vivant étant dispersé en phase aqueuse, les lipides jouent leur rôle physiologique en milieu aqueux. Un grand intérêt biologique s'attache donc à l'étude des corps qui les solubilisent ou les émulsionnent. On sait depuis très longtemps que les savons anioniques possèdent de telles propriétés. L'action des savons cationiques méritait d'être étudiée.

1° GLYCÉRIDES ET STÉRIDES. — Les glycérides sont émulsionnés en milieu acide par le zéphirol, par la sapamine ou le quartamon. Les stérides donnent également une émulsion avec la solution de zéphirol ou de sapamine MS.

Ces émulsions ne sont pas extrêmement stables. En particulier si on les agite avec l'éther, elles cèdent relativement facilement la graisse neutre à ce solvant. Nous avons cependant noté par des dosages de cholestérol (Méthode de Machebœuf et Delsal (25)) que l'extraction par l'éther d'une émulsion d'oléate de cholestéryle était d'autant plus lente et d'autant moins complète qu'on opère en présence de plus grandes quantités de zéphirol.

Cet effet de solubilisation des stérides par le zéphirol est très peu important par rapport à celui que nous avons observé pour le cholestérol et surtout pour les phosphatides.

2° CHOLESTÉROL. — Le cholestérol donne avec les savons inversé des complexes très intéressants.

Si on met en contact des cristaux de cholestérol et une solution de zéphirol, on constate que le cholestérol gonfle et donne des émulsions très stables. Cette réaction a lieu en milieu neutre comme en milieu acide.

Au microscope, cette action du zéphirol est tout à fait spectaculaire. Il se forme autour du cristal de cholestérol de magnifiques figures de myéline (322).

Cette réaction des stérols était déjà connue pour les savons anioniques (317, 415, 424, 425). Nos expériences (322) nous ont prouvé que ces « complexes » se forment mieux encore avec les savons cationiques : il ne s'agit donc pas de liaisons par le groupe acide du savon et la fonction alcool du stérol, mais de liaisons par les chaînes hydrophobes des savons et du cholestérol. Le zéphirol, la sapamine MS et le quartamon agissent de façon semblable sur le cholestérol. Le désogène, en revanche, s'est montré inactif quel que soit le pH. La propriété n'est donc pas absolument générale. M. Dervichian en a fait une étude assez détaillée et complète (69) liant cette propriété à une relation de ces complexes se formant molécule à molécule. Nous avons montré que le cholestérol s'unit stœchiométriquement au savon

inversé. Pour cela, nous avons utilisé la propriété hémolysante de ce dernier. L'inhibition de l'hémolyse par le cholestérol s'explique par la formation de complexes qui cachent les molécules de savon.

Le complexe zéphirol-cholestérol ainsi formé donne une émulsion stable dans l'eau ; l'addition de sels acides ou bases ne provoque pas sa floculation ; l'addition d'alcool en petite quantité précipite le cholestérol. Le complexe est soluble dans un mélange d'alcool et d'éther ou d'alcool et de chloroforme. Il est également soluble dans le solvant de Caminade (acétone 73, eau 18, alcool 9).

Nous avons cherché si, grâce à cette émulsification le cholestérol ne devenait pas capable de traverser les membranes de collodion. Malgré une dialyse prolongée, nous n'avons pas pu mettre en évidence un tel passage.

Les complexes zéphirol-cholestérol si stables en phase aqueuse s'opposent au passage du cholestérol dans l'éther : si on agite ces émulsions avec l'éther, il passe relativement peu de cholestérol dans l'éther ; voici une expérience à ce sujet :

Nous avons préparé des complexes contenant une quantité plus ou moins importante de zéphirol et chaque échantillon fut *agité avec un volume égal d'éther* qui fut ensuite séparé par décantation.

Cholestérol	Zéphirol	Cholestérol retrouvé dans l'éther
600 μg	200 μg	210 μg soit 35 o/o
600	400	180 » 30
600	1 400	120 » 20

Le zéphirol lui-même étant plus soluble dans l'eau que dans l'éther, le complexe zéphirol-cholestérol semble suivre le sort du zéphirol, et le coefficient de partage du complexe se rapproche de celui du zéphirol. Le zéphirol empêche donc le cholestérol de passer dans l'éther : nous verrons au chapitre suivant l'application de ce fait au cours de la délipidation du sérum (p. 54).

Le complexe zéphirol cholestérol n'a pas perdu le pouvoir de précipiter les protéines : au contraire la présence de cholestérol rend la combinaison protéine-zéphirol moins soluble (p. 53).

3° LÉCITHINE. — La lécithine dont nous nous sommes servi est soit une ovolécithine brute commerciale, soit une ovolécithine purifiée préparée par la méthode de Levene (229). Ce phosphatide est assez hydrophile. La lécithine donne en effet plus facilement que le cholestérol des émulsions avec l'eau. La méthode que nous avons utilisée précédemment pour émulsionner le cholestérol, convient ici parfaite-

ment pour obtenir une émulsion de lécithine (à 10/o par exemple) dans la solution de saponium ou dans l'eau pure.

Lorsqu'on ajoute du zéphirol à une émulsion de lécithine dans l'eau pure, la solution devient parfaitement limpide.

Par exemple 1 cm³ d'émulsion de lécithine à 10/o est totalement éclairci à partir de 0,5 cm³ de zéphirol à 10/o.

Alors que l'action des saponiums sur les stérols relève de l'action suspensive et protectrice des détergents, l'action sur les phosphatides nous donne un exemple d'*action solubilisante* analogue à celle que l'on connaît déjà pour les savons ordinaires (oléate, ricinoléate, etc.) et les sels biliaires (234, 408, 409, 410).

Si nous comparons les divers savons cationiques dans leur action solubilisante sur la lécithine, nous constatons qu'ils se comportent différemment selon la chaîne grasse. On peut estimer la quantité minimum nécessaire pour éclaircir 1 cm³ d'une émulsion de lécithine à 10/o.

	Poids en mg.	Rapport en poids sapamine lécithine	Coefficient proportionnel en prenant 100 pour le zéphirol	Poids moléculaire	Rapport moléculaire saponium lécithine
Zéphirol . . .	5	0,5	100	340	1,25
Sapamine MS.	8	0,8	160	507	1,30
Désogène . . .	3,5	0,35	70	460	0,65
Cetavlon . . .	6	0,6	120	350	1,50
Sapamine CH.	18	1,2	240	417	2,30

La sapamine CH est moins active pour dissoudre la lécithine. Rappelons qu'il s'agit d'une amine tertiaire. Le désogène est relativement deux fois plus actif que les autres saponiums (zéphirol, sapamine MS et cetavlon) : sa structure chimique avec une chaîne ramifiée est sans doute à l'origine de cette dissemblance.

La lécithine est donc bien solubilisée dans l'eau par les savons cationiques. Que devient dans ces conditions sa solubilité dans l'éther ? Nous avons agité avec de l'éther de telles solutions de lécithine à divers pH (de pH 4 à pH 9) quel que soit le pH, le résultat fut toujours le même : absence totale de phosphore dans l'éther. Retenus en phase aqueuse par le zéphirol, les phosphatides sont donc devenus inextractibles par l'éther. En agitant une solution étherée de lécithine avec une solution aqueuse de zéphirol, on observe même le passage de la lécithine dans la phase aqueuse.

Mélangions enfin une solution étherée de lécithine avec une solution étherée de zéphirol en quantité suffisante : le mélange est par-

faitement limpide. Ajoutons une phase aqueuse neutre, nous voyons une couche huileuse se séparer à l'interface entre l'eau et l'éther. Cette phase contient de la lécithine et du zéphirol. Il suffit alors d'acidifier légèrement pour voir la couche lipidique se dissoudre entièrement dans l'eau.

La solution aqueuse de lécithine-zéphirol est relargable par le sulfate d'ammonium à demi-saturation : la couche liquide jaune apparaît en surface. Il s'agit d'un coacervat composé de lécithine et de zéphirol.

La solubilité de la lécithine dans une solution de zéphirol, ainsi démontrée, nous parut comparable à la solubilisation des protéines dans un excès de zéphirol. Nous avons alors cherché à étendre la comparaison pour les doses plus faibles de zéphirol, et nos essais ont confirmé notre hypothèse.

Soient 10 tubes contenant chacun 10 cm³ de l'émulsion de lécithine à 1 o/o. Avec des quantités croissantes de zéphirol : nous observons une précipitation de la lécithine jusqu'à 0,4 cm³ de zéphirol à 1 o/o.

Lécithine .	0,1 g.	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Zéphirol. .	0,5 mg.	1	2	3	4	5	6	10	20	40
$\frac{\text{mol. zéph.}}{\text{mol. lécith.}}$	1/80	1/40	1/20	1/14	1/10	1/8	1/7	1/4	1/2	1
Aspect . .	↓	↓	↓	↓	↓	émuls.	émuls.	émuls.	émuls. claire	sol.

La lécithine étant amphotère comme les protéines, on pouvait prévoir qu'elle ait des propriétés différentes selon le pH. En effet, en milieu nettement acide, donc au-dessous de son point iso-électrique, la lécithine ne précipite pas par le zéphirol.

Dans la zone de concentration en zéphirol insuffisante pour solubiliser la lécithine dans l'eau, l'éther est capable de s'emparer d'une partie de la lécithine.

La lécithine est-elle introduite en sandwich entre les couches parallèles de zéphirol, ainsi qu'il est classique de l'imaginer ? Si nous diluons une solution de savon, on sait que les micelles se dispersent et que le savon se trouve en solution moléculaire à partir d'une concentration de 1/1 000 environ. Si maintenant nous diluons un mélange de lécithine et de zéphirol à 1/10 000 environ, la solution reste limpide. Ceci nous montre que la lécithine et le saponium sont

intimement liés et que le complexe zéphirol-lécithine ne se disperse pas à l'état strictement moléculaire mais à l'état de micelle mixte, sans doute très petite dans laquelle zéphirol et lécithine possèdent tous deux des radicaux hydrophobes liés et des radicaux hydrophiles en contact avec le milieu aqueux et participent chacun à la solubilité de l'ensemble.

Si, inversement, on cherche à solubiliser la lécithine par une solution de savon cationique plus diluée que 1/1 000 on n'obtient qu'une solution colloïdale opalescente nettement trouble, qui diffère absolument de la solution limpide obtenue par dilution de la solution à 1/100. Ceci vient donc confirmer le rôle des micelles de savon dans la solubilisation. Et il semble que la formation de l'édifice zéphirol-lécithine ne soit plus dissociable par dilution comme les micelles de savon pur.

Dans le cas du cholestérol, ou d'autres molécules purement hydrophobes (caroténoïdes par exemple) (1), la liaison par les radicaux hydrophobes du savon et du stérol est aussi forte qu'avec la lécithine, mais c'est la seule fonction amine du zéphirol qui permet la solubilisation de l'ensemble. On comprend donc pourquoi cette solubilisation est moins bonne et n'aboutit qu'à une émulsion relativement grossière du cholestérol.

Nous avons observé que la bilirubine est aussi solubilisée par les saponiums et devient alors colorable directement par la réaction d'Hymans van den Bergh.

4° CÉRÉBROSIDES. — Les cérébrosides se rapprochent des phosphatides par leur faible affinité pour l'eau, mais s'en distinguent par leur insolubilité dans l'éther.

Nous avons utilisé deux préparations de cérébroside que nous avons faites l'une à partir de cerveau de chien, l'autre à partir d'une rate humaine pathologique (maladie de Gaucher) (321). Le premier est un cérébroside à galactose, le second un cérébroside à glucose. Ils se comportent de la même façon.

Ces corps sont difficiles à émulsionner dans l'eau. En effet, on ne peut pas partir d'une solution éthérée comme pour les stérols ou la lécithine. Cependant lorsqu'on essaye de les émulsionner en présence de savon cationique, on a la surprise de les voir se dissoudre en chauffant la solution près de 100° C. En laissant refroidir la solution obtenue, elle se trouble à froid en donnant une émulsion.

Cette émulsion s'éclaircit quand on acidifie par l'acide chlorhydrique $n/10$ au-dessous d'un pH voisin de 4. Elle se trouble de nouveau quand on ajoute alors de la soude $n/10$.

(1) Références 40, 211, 217, 245, 381, 382, 383, 420.

Le cérébroside est d'autant plus soluble que la quantité de zéphirol est plus grande.

Il semble donc que le cérébroside donne avec le zéphirol des complexes analogues à ceux que nous avons rencontrés pour la lécithine ; mais leur solubilité est plus faible. Le changement de solubilité observé ci-dessus, au voisinage de $pH\ 4$, peut s'interpréter comme pour les protéines par l'existence d'un pH isoélectrique du cérébroside qui serait ainsi voisin de 4 (compris entre 4 et 5).

Il nous paraît intéressant de signaler cette propriété des savons cationiques, étant données les difficultés auxquelles on se heurte dans l'étude des cérébrosides, à cause du très petit nombre de solvants utilisables. Nous verrons plus loin une application de cette propriété (voir p. 64).

Notons enfin que l'émulsion de cérébroside ne se solubilise en milieu acide que si l'on utilise l'*acide chlorhydrique* ou l'*acide phosphorique*. L'*acide sulfurique* et l'*acide acétique* ne permettent pas une telle solubilisation. Quant à l'*acide nitrique*, nous avons vu qu'il précipite le zéphirol et le désogène ; *a priori* il ne peut donc pas servir dans cette réaction de solubilisation par le zéphirol, ni par le désogène ; mais même pour les autres agents essayés (sapamine MS, sapamine CH, cétavlon), dont les nitrates sont solubles, non seulement l'acide nitrique n'a pas éclairci l'émulsion cérébroside-saponium, mais au contraire a contribué à l'opacifier, comme si ces nitrates étaient rendus moins solubles par l'adjonction de molécules de cérébrosides.

Les sulfates, acétates et nitrates de saponiums sont donc dans un état différent des chlorures ou des phosphates (voir p. 10).

CONCLUSION. — En résumé, les saponiums émulsionnent les lipides en milieu acide ; ils donnent avec le cholestérol des complexes stœchiométriques aux propriétés physiques et biologiques intéressantes ; ils solubilisent dans l'eau les phosphatides, les cérébrosides et certains pigments hydrophobes.

III. — ACTION SUR LES CÉNAPSES LIPIDO-PROTÉIDIQUES

La solubilité au sein de la matière vivante de molécules insolubles a, depuis toujours, intrigué les chercheurs et les hypothèses ne manquent pas pour expliquer l'état des lipides dans les cellules et les humeurs biologiques. Depuis les travaux fondamentaux de M. Machebœuf et de son école (250, 254, 255, 261 à 267, 394 à 402) il est devenu classique de dire que protéines et lipides sont liées sous forme de cénapses par des forces s'exerçant entre chaînes hydrophobes des

protéines et des lipides. Rappelons qu'une des principales caractéristiques de ces cénapses est de ne pas céder les lipides à l'éther seul (250) et de les masquer aux colorants des graisses.

Mais l'addition de certains réactifs plus ou moins spécifiques est capable de libérer les lipides et de permettre leur passage dans l'éther. L'alcool éthylique agit dans ce sens et des doses assez faibles d'alcool permettent une bonne délipidation des cénapses (M. Machebœuf et G. Sandor (261, 262)).

Les savons anioniques (264, 395), les sels biliaries (400), les saponosides (398, 401) sont comme l'alcool capables de détacher les lipides des protéines. C'est à M. Machebœuf et F. Tayeau qu'on doit l'étude, si belle et si complète, de la délipidation spécifique par ces agents détersifs.

La spécificité des saponosides et des sels biliaries, vis-à-vis du cholestérol semble en relation avec la parenté de structure de ces dérivés. D'où la théorie de M. Machebœuf et F. Tayeau de la substitution isostérique, ou plutôt icéломorphique, par des molécules de forme presque identique. Les expériences de F. Tayeau sont donc en bon accord avec l'hypothèse de liaisons type Van der Waals entre lipides et protéines.

Nous avons repris cette étude à l'aide de l'excellent réactif que constituent les *savons cationiques*, parfaitement solubles à tous les pH et quelle que soit la concentration. Le sérum total est un matériel d'étude très pratique pour ces cénapses lipidoprotéidiques étant donné que ceux-ci sont déjà dissous dans l'eau. Il serait évidemment d'un grand intérêt d'étendre ces résultats aux cénapses endocellulaires.

1. — EXTRACTION DES LIPIDES PAR L'ÉTHER EN PRÉSENCE DE SAVONS CATIONIQUES

L'expérience qui consiste à agiter avec l'éther un mélange de sérum de cheval et d'un volume égal d'une solution aqueuse de zéphirol à 1 0/00, nous donne le résultat brutal attendu : le sérum se trouble, puis se décolore partiellement au profit de l'éther qui s'empare d'une certaine quantité de lipides (40 0/0 environ). Le témoin dans lequel la solution de zéphirol est remplacée par de l'eau ne laisse absolument rien extraire par l'éther.

Deux facteurs semblent très importants : la concentration relative de savon et le pH :

1° EXTRACTION DES LIPIDES EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN ZÉPHIROL (extraction en milieu neutre pH 7,3).

Il existe un optimum de concentration de savon ou de saponosides pour le passage des lipides dans l'éther (264, 398). Il en est également ainsi dans le cas de nos amines quaternaires :

Faisons une gamme de concentration en zéphirol :

Sérum de cheval	Zéphirol	Eau	Ether	Cholestérol extrait	Phosphore extrait
1 cm ³	0	1 cm ³	10 cm ³	0	0
»	0,1 cm ³ à 10/100	0,9	»	0	0
»	0,2 »	0,8	»	0	0
»	0,4 »	0,6	»	200 µg.	0
»	0,5 »	0,5	»	400	0
»	0,7 »	0,3	»	700	0
»	0,9 »	0,1	»	650	0
»	0,10 » à 10/10	0,9	»	600	0
»	0,12 »	0,88	»	200	0
»	0,14 »	0,86	»	150	0
»	0,20 »	0,8	»	100	0
»	1 »	0	»	100	0

Ce tableau résume les résultats des dosages de phosphore lipidique et de cholestérol extractibles par l'éther après 4 heures de contact.

1° Il montre l'absence de phosphore dans l'éther quelle que soit la quantité de zéphirol ajoutée. Notre technique analytique nous aurait permis de déceler 1 µg. de phosphore et notre échantillon de sérum mis en œuvre contenait 40 µg. de phosphore lipidique.

2° Il met en évidence l'optimum pour la dose de zéphirol ; ici environ $2 \cdot 10^{-3}$ mol. mg./cm³ de sérum.

3° L'extractibilité du cholestérol en fonction de la concentration en saponium commence assez brusquement après une zone où le zéphirol semble inactif.

4° La quantité de cholestérol extraite à l'optimum représente presque la totalité du cholestérol du sérum qui contenait 750 µg. de cholestérol par centimètre cube. Nous avons vérifié que le sérum restant contenait le reste du cholestérol et nous avons trouvé des valeurs généralement inférieures à 50 µg. L'extraction du cholestérol dépasse donc 90 0/0 et atteint même 97 0/0.

5° L'excès de zéphirol diminue rapidement et considérablement l'extractibilité du cholestérol.

C'est seulement pour des doses énormes de zéphirol (permettant la solubilisation complète des protéines sériques) que l'on voit à nouveau s'élever la proportion de cholestérol extractible : en effet pour 1 cm³ de zéphirol à 10 0/0 l'extrait éthéré contenait dans le cas du sérum précédent 300 µg. de cholestérol.

Nous pouvons représenter graphiquement cette extractibilité du cholestérol en fonction de la quantité de zéphirol ⁽¹⁾ (fig. 21).

⁽¹⁾ Nous n'avons pas représenté la partie de la courbe correspondant aux fortes doses de zéphirol.

Nous trouvons donc que le zéphirol permet l'extraction par l'éther de la quasi-totalité du cholestérol. Mais la zone optimale de concentration en zéphirol est assez étroite : au-dessous de cette zone, le zéphirol ne décolle pas de cholestérol ; au-dessus, il semble inhiber son passage dans l'éther.

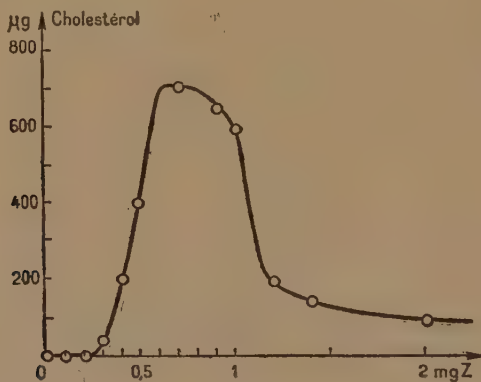


Fig. 21. — Extraction du cholestérol par l'éther en fonction de la dose de zéphirol.

2° INFLUENCE DU pH SUR L'EXTRACTION DES LIPIDES EN PRÉSENCE DE ZÉPHIROL. — Nous avons mis en évidence une influence importante du pH sur l'extractibilité des lipides sériques par l'éther en présence

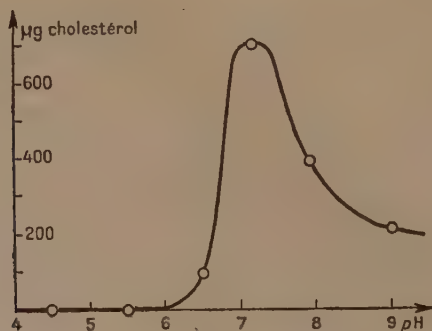


Fig. 22. — Extraction du cholestérol par l'éther en fonction du pH (dose de zéphirol constante 0,7 mg.).

de savon cationique. Si nous extrayons par l'éther une solution contenant 1 cm³ de sérum et 1 cm³ de solution de zéphirol à 0,7 o/oo (soit l'optimum d'extractibilité à pH 7,3) amenée à des pH divers, nous

constatons que de chaque côté de ce pH l'extractibilité du cholestérol diminue énormément, comme si le saponium n'était actif pour délipider le sérum qu'au pH même du sérum.

Cette conclusion est absolument fausse. En effet, reprenons une gamme de concentration en zéphirol, en opérant non plus à pH 7,3 mais à pH 4.

Nous trouvons ici les mêmes caractéristiques que dans le cas précédent (pH 7,3) : pour les phospholipides, inextractibilité complète ; pour le cholestérol, zone d'inactivité apparente, optimum d'action, inhibition par un excès de zéphirol. Nous pouvons tracer sur un graphique cette extraction du cholestérol en fonction de la quantité de zéphirol à pH 4.

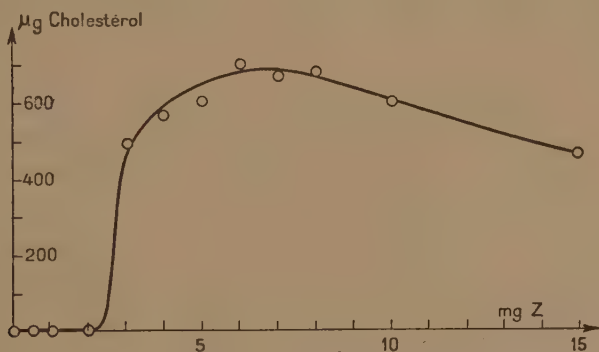


Fig. 23. — Extraction du cholestérol par l'éther à pH 4.

La zone d'extraction est plus large que dans le cas précédent à pH 7,3, mais ceci peut être dû à la durée différente du contact avec l'éther (48 heures au lieu de 4 heures) (voir p. 48). Notons aussi que le rendement de l'extractibilité est un peu moins bon ⁽¹⁾.

La différence essentielle réside dans le décalage net de la courbe vers les grandes quantités de zéphirol : il faut plus de 5 fois de zéphirol à pH 4. Nous pouvons conclure qu'en milieu acide, la délipidation des cénapses nécessite une bien plus grande quantité de savon cationique.

Au-dessous du pH isoélectrique des protéines sériques, l'extractibilité des lipides ne subit pas de modification importante : la courbe

(¹) Le sérum contenait cette fois 850 µg de cholestérol par centimètre cube. Qualitativement on voit se former à l'interface sérum-éther une couche jaune brunâtre qui disparaît plus ou moins après 24 à 48 heures laissant un léger résidu brun. Le contact ayant été maintenu 48 heures à pH 4, le sérum a présenté une gélification.

d'extraction du cholestérol, par exemple, est à peu près la même à pH 2 qu'à pH 4.

L'influence du pH sur la stabilité des cénapses lipido-protéidiques a déjà été soulignée, en particulier par les travaux de B. Delage (62) sur la délipidation par l'éther en présence d'alcool et de F. Tayeau (401) sur la délipidation en présence de savons anioniques et de saponosides. Il nous paraît intéressant de souligner l'analogie existant entre les résultats de Delage avec les alcools et les nôtres avec les saponiums. Plus le pH baisse, plus il faut d'alcool pour délipider le sérum. Cette analogie d'action entre alcools et détergents cationiques a déjà été notée à propos de la précipitation des protéines (p. 5). Ceci s'accorde avec l'hypothèse d'une action dissociante de ces corps possédant une chaîne hydrophobe et une fonction hydrophile non spécifique, action dissociante qui serait attribuable à une liaison par chaînes polyméthyléniques plutôt qu'à une liaison par groupes polaires.

3° INFLUENCE DU TEMPS DE CONTACT. — Le temps de contact entre la phase aqueuse et l'éther a une nette influence sur l'extractibilité du cholestérol (il ne fait pas disparaître l'extractibilité des phospholipides). Cette influence ne se fait sentir que dans la zone d'inhibition par un excès de zéphirol.

La zone d'extractibilité s'élargit avec le temps. C'est dans cette zone qu'on observe le trouble de la solution et la précipitation d'une première fraction protéidique en l'absence d'éther (voir pp. 17 et 50). Ce précipité riche en lipides explique le retard apporté à l'extraction du cholestérol par l'éther.

4° INFLUENCE DE L'ADDITION D'ALCOOL SUR LA DÉLIPIDATION EN PRÉSENCE DE ZÉPHIROL. — En l'absence de saponium, le passage des lipides dans l'éther est considérablement favorisé par la présence d'une petite quantité d'alcool ou d'acétone (insuffisante pour dénaturer les protéines) (62, 261, 262).

L'expérience montre que l'alcool augmente très légèrement le passage des lipides dans l'éther : en particulier il permet le passage d'un peu de phospholipides.

5. INFLUENCE DE LA NATURE DU SAVON CATIONIQUE. — Tous les savons cationiques que nous avons essayés ont eu la même action : ils ont permis d'extraire par l'éther environ 40 o/o des lipides comprenant la quasi-totalité du cholestérol et absolument pas de phosphore lipidique.

Ce comportement semble donc une propriété générale des savons cationiques, en opposition avec les savons d'acide gras. Même la sapamine MS qui dérive directement d'un acide gras (oléique) se comporte comme le zéphirol.

Nous avons vérifié que ce mode d'action était bien caractéristique du saponium et non pas simplement du cation ammonium : une amine quaternaire sans longue *chaîne* (le chlorure de benzyléthyl-diméthylammonium qui ne diffère du zéphirol que par l'absence de la chaîne grasse) s'est montrée totalement inactive.

Le rôle de la chaîne hydrophobe est donc fondamental dans l'action délipidante des savons, et ce ne sont que les modalités de la délipidation qui dépendent de la fonction hydrophile.

La comparaison entre les divers saponiums ne montre que des différences quantitatives. Nous avons comparé le déplacement du cholestérol par le zéphirol, la sapamine MS et le désogène.

1 cm³ de sérum, additionné de 1 cm³ d'eau contenant des quantités croissantes de saponium, est agité avec 10 cm³ d'éther rectifié. Après 48 heures de contact, l'éther est décanté et évaporé; le résidu est repris par le chloroforme et le dosage du cholestérol est effectué sur 1/4 de la solution.

Les résultats sont les suivants (cholestérol exprimé en μ g. extrait de 1 cm³ de sérum contenant 950 à 1 000 μ g. de cholestérol):

Saponium en mg.	Zéphirol	Désogène	Sapamine MS
0,05	0	0	0
0,10	0	0	0
0,20	0	150	0
0,30	100	850	0
0,40	200	900	0
0,60	850	900	150
0,80	850	900	300
1	850	850	800
1,30	850	800	900
1,50	850	500	950
1,70	850	400	950
2	850	360	950
2,70	900	250	950
3	800	175	950
3,50	800	175	900
4	800	160	850
4,50	800	70	275
5	500	100	200
6	425	170	150
7	360	360	150

La zone qui différencie les trois savons cationiques est celle qui correspond au minimum de saponium permettant le passage du cholestérol dans l'éther : les doses nécessaires des trois dérivés étudiés sont différentes. Elles sont respectivement voisines de 0,32 mg. pour le désogène, 0,59 mg. pour le zéphirol, et 1,00 pour la sapamine MS. On peut déterminer plus exactement les rapports d'activités des

trois savons en superposant sur un même graphique les trois courbes grâce à un choix approprié des abscisses respectives.

Les trois savons cationiques se classent donc vis-à-vis de la délipidation dans le rapport suivant, qui diffère sensiblement du rapport des poids moléculaires : les nombres sont rapportés au zéphirol auquel nous avons arbitrairement donné la valeur 100 :

	Délipidation	Poids moléculaire moyen
Zéphirol	100	110
Désogène.	54	135
Sapamine MS	170	150

2. — SORT DES LIPIDES DANS LA PRÉCIPITATION DES PROTÉIDES DU SÉRUM PAR LES SAVONS CATIONIQUES

Lorsqu'en l'absence d'éther on ajoute au sérum une petite quantité de zéphirol (correspondant environ à l'optimum de décollement du cholestérol en présence d'éther : 0,7 mg. par centimètre cube de sérum), une mince pellicule contenant des lipides vient surnager au bout d'un temps plus ou moins long. Si on augmente la quantité de zéphirol (1 mg. par cm³ de sérum), cette pellicule est émulsionnée dans le sérum qui devient opalescent, se trouble franchement, puis donne un précipité floconneux. Ce précipité, peu abondant (voir p. 17) contient 2,8 mg. de protéines et une forte proportion de lipide (3,5 mg. soit près des 3/4 des lipides du sérum), cholestérol 0,7 mg., phosphore lipidique 20 µg. (soit 60 o/o). Les protéines du sérum ne commencent à précipiter en quantité importante que pour une quantité de zéphirol nettement plus grande (7 mg. par cm³ de sérum) comme nous l'avons déjà montré au chapitre I, p. 17.

Nous voyons qu'une fraction importante des lipides du sérum (près des 3/4) se trouve précipitée. Nous observons donc une sorte de délipidation par précipitation, meilleure que par l'éther puisque 60 o/o des phospholipides y participent.

1° PRÉCIPITATION DES PROTÉIDES DU SÉRUM A pH CONSTANT EN FONCTION DE LA QUANTITÉ DE ZÉPHIROL. — En opérant toujours à pH 7,3, nous avons ajouté des quantités croissantes de zéphirol à 2 cm³ de sérum de cheval. Le volume était toujours amené à 3 cm³ par de l'eau distillée. Le précipité était séparé par centrifugation et nous avons déterminé sur le précipité et sur le surnageant la quantité de pro-

téines, de lipi les totaux (extrait alcool-étheré comprenant le zéphirol), de cholestérol et de phosphore lipidique.

Les chiffres du tableau sont indiqués pour 1 cm³ de sérum.

Zéphirol par cm ³ de sérum	Précipité				Surnageant			
	Pro- téines	Lipides + zéphirol	Choles- térol	Phos- phore	Pro- téines	Lipides + zéphirol	Choles- térol	Phos- phore
0 mg.	0 mg.	0 mg.	0 µg.	0 µg.	94 mg.	4,5 mg.	950 µg.	33 µg.
0,4	0,5	—	0	0	94	5	950	33
0,6	1	1	100	2	92	4	850	30
0,8	1,25	2	360	10	93	3	550	20
1,0	2,8	4	700	20	92	1,5	200	11
1,25	2,7	4	740	18	92	2	200	13
1,50	2,8	4	740	18	—	—	—	—
2	2,8	4	750	18	—	—	—	—
2,50	3	4,3	740	16	94	2,3	150	13
5	6	4	740	16	—	—	—	—
12	47	13	700	15	45	—	—	—
50	1,5	5	670	12	80	—	—	—

(Ces données sont partiellement reportées sur la *figure 9*, p. 18).

1° La précipitation des protéines permet de caractériser trois fractions : la première peu abondante précipite de 0,4 mg. à 7 mg. de zéphirol par centimètre cube de sérum ; la seconde, qui représente la moitié des protéines du sérum précipite entre 7 mg. et 60 mg. ; la troisième ne précipite pas à pH 7,3.

2° La précipitation des lipides est à peu près constante durant la précipitation des protéines, à partir de 1 mg. de zéphirol par centimètre cube de sérum. La même quantité de lipides accompagne le précipité protéinique quel qu'il soit. Seul l'excès de zéphirol, dans la zone où il redissout le précipité protidique, diminue la quantité de lipides précipitables.

3° Les lipides précipitables accompagnent donc la première fraction protéinique, qui ne représente pourtant qu'une partie infime des protéines du sérum (3 à 6 o/o).

4° La quantité de lipides précipitables ne représente pas la totalité des lipides du sérum puisqu'il reste toujours une petite quantité de cholestérol et de phospholipides dans le liquide surnageant. Cependant elle atteint 75 o/o des lipides totaux, 80 o/o du cholestérol, 60 o/o du phosphore lipidique.

2° PRÉCIPITATION DES PROTÉIDES DU SÉRUM EN FONCTION DU pH. — Voici une série d'expériences faites à divers pH avec une quantité constante de zéphirol. Cette quantité a été choisie assez importante

pour permettre une précipitation à peu près totale des protéines du sérum.

Nous avons opéré comme plus haut en ajoutant à 2 cm³ d'un sérum ⁽¹⁾, 12 cm³ de zéphirol à 5 o/oo contenant des quantités variables d'acide chlorhydrique *n*/10 ou de soude *n*/10.

Dès la précipitation d'une faible quantité de protéines sériques, nous assistons à une précipitation importante de lipides. Puis quand le pH augmente, la quantité de protéines précipitées augmente (ainsi que celle de zéphirol) mais sans modification de la quantité de cholestérol et de phospholipides contenue dans ce précipité.

Représentons graphiquement ces résultats en mettant en abscisses

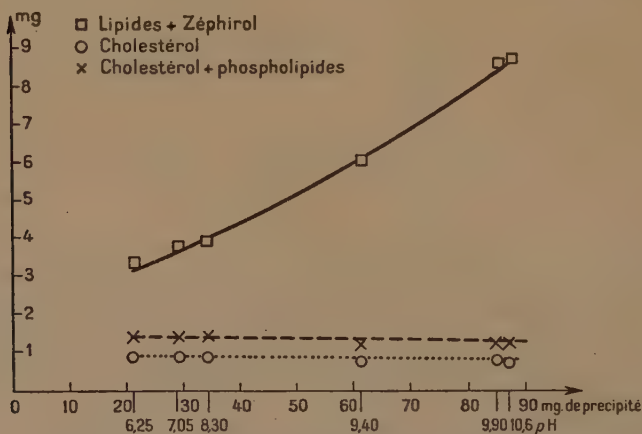


Fig. 24. — Précipitation des lipides en fonction du pH (et du poids des protéines précipitées).

le poids du précipité (par cm³ de sérum) et en ordonnées des lipides totaux (lipides + zéphirol entraîné dans le précipité), le cholestérol et la somme cholestérol + phospholipides.

Ce graphique suggère que la quantité de lipides précipitées est à peu près constante et que seule varie la teneur du précipité en zéphirol (le rapport zéphirol/protéines étant voisin de 8 o/o).

Même lorsque le sérum est presque totalement privé de ses protéines, la quantité de lipides précipitables est la même et il reste en solution dans le liquide surnageant une fraction de lipides non précipitables.

(¹) Il s'agit d'un autre sérum de cheval.

Il semble donc qu'on puisse conclure que la précipitation de protéines du sérum par le zéphirol entraîne toujours la même fraction des lipides du sérum. Les lipides seraient ainsi divisés en deux fractions distinctes, les lipides précipitables qui accompagnent une petite fraction protéinique et les lipides non précipitables, qui restent en solution, sans support protéinique après la précipitation totale des protéines sériques.

3° ENTRAÎNEMENT DE LIPIDES DANS LA PRÉCIPITATION DE PROTÉINES. — Afin d'étudier le comportement éventuel de lipides libres en présence de protéines et de saponiums, nous avons préparé artificiellement des mélanges de protéines, de lipides et de zéphirol :

a) *Phosphatides*. — A 1 cm³ d'une solution de sérum albumine (cristallisée) à 60 mg./cm³ amenée à pH 9,5 par de la soude *n*/10, nous ajoutons une solution aqueuse de lécithine et zéphirol (0,66 mg. de lécithine par cm³ de solution de zéphirol à 1 o/o). Le précipité obtenu après addition de 1,5 cm³ est centrifugé. Le dosage de phosphore lipidique donne le résultat suivant :

P de la lécithine mise en œuvre : 40 µg.

P de la lécithine retrouvée dans le précipité : 32 µg.

Ceci nous prouve que *la précipitation de l'albumine entraîne les phosphatides présents dans le milieu.*

b) *Cholestérol*. — Le cholestérol qui donne avec les saponiums des associations capables de neutraliser les propriétés de ces derniers, aurait pu se comporter comme un inhibiteur de la précipitation des protéines. Nous avons donc refait l'expérience précédente avec une solution de zéphirol contenant en émulsion du cholestérol (10 mg. de cholestérol par cm³ de zéphirol à 1 o/o). Non seulement le cholestérol n'empêche pas la précipitation de l'albumine, mais encore *la quasi-totalité du cholestérol se retrouve dans le précipité*. Nous avons de plus mis en évidence l'action favorisante du cholestérol sur la floculation des protéines.

Lorsqu'on observe la précipitation par le zéphirol de la sérum-albumine, à un pH voisin de 8, on trouve une zone de précipitation en fonction de la concentration relative en zéphirol. Si au lieu de zéphirol on se sert d'une émulsion de cholestérol dans le zéphirol, la zone de précipitation n'est pas modifiée. Mais si nous opérons en milieu très dilué : soit 2,5 mg. d'albumine + 0,5 mg. de zéphirol dans 4 cm³ d'eau, la précipitation est remplacée par un trouble de la solution en l'absence de cholestérol ; tandis qu'avec l'émulsion de cholestérol, la précipitation a lieu sous forme d'une floculation presque instantanée. Le cholestérol accélère la floculation. Entrant

dans la formation du complexe albumine-zéphirol, il en diminue la solubilité par son hydrophobie (¹).

3. — DISCUSSION. INTERPRÉTATION

Il nous faut maintenant chercher à interpréter les résultats observés, les coordonner par des expériences complémentaires et en dégager ce qu'ils apportent à notre connaissance de la délipidation par les détergents et de la structure des cénapses.

1° DÉLIPIDATION EN PRÉSENCE D'ÉTHER. — La forme de la courbe de délipidation en fonction de la quantité de savon cationique pose un certain nombre de problèmes :

a) La partie descendante de la courbe qui exprime qu'un excès de savon inhibe le passage du cholestérol dans l'éther, peut être expliquée grâce aux observations faites p. 39 sur le mélange de zéphirol et de cholestérol.

De plus l'existence d'un précipité protidique explique le ralentissement de l'extraction par l'éther dans cette zone.

Enfin dans la zone de grand excès en zéphirol, où le précipité ne se forme plus, le passage du cholestérol dans l'éther remonte à peu près au taux prévu pour le mélange zéphirol-cholestérol en l'absence de sérum (voir p. 39 et 45).

b) Dans la zone optimale de concentration en savon cationique, le cholestérol est totalement extractible par l'éther.

Parmi les réactifs possédant cette propriété (alcools, savons anioniques, saponosides cyclopentanophénanthréniques, sels biliaires, savons cationiques), les uns (alcools, savons anioniques) détachent cholestérol et phospholipides, mais seulement partiellement; les autres paraissent détacher le cholestérol et non les phospholipides. Nous avons noté l'analogie de comportement des savons cationiques et des saponosides cyclopentanophénanthréniques. Une autre analogie, qui nous paraît intéressante, peut être faite *entre l'action des savons cationiques et celle du froid* : en effet, il est possible de rendre extractible par l'éther une fraction lipidique importante par congélations à très basse température (— 70° C) et décongélations du

(¹) C'est sans doute à ce type de réaction qu'on peut rattacher la floculation du complexe céphaline-cholestérol par certaines protéines sériques. Ce test, utilisé depuis quelques années en clinique (187, 294) semble pouvoir refléter une modification quantitative du rapport globulines- γ /albumines liée à une atteinte hépatique. Il caractérise en effet l'augmentation des globulines- γ ainsi que la diminution du pouvoir inhibiteur des autres protéines sur la floculation des globulines- γ .

sérum : c'est le principe de la méthode de McFarlane (248) ; d'après cet auteur, l'éther serait capable d'extraire, outre le cholestérol, une certaine quantité de phospholipides. Mais ces résultats ne sont pas confirmés par J. L. Delsal (65), qui, en opérant avec de l'éther totalement privé d'alcools, a montré que la technique de McFarlane laisse bien passer dans l'éther le cholestérol, mais pas du tout de phosphore lipidique ; avec une minime quantité d'alcool dans l'éther, il devient possible d'extraire une petite fraction phosphatidique. Ces résultats sont en tous points comparables à l'action du zéphirol. Nous verrons plus loin (chap. IV, p. 76) un autre exemple d'action parallèle entre le froid et les savons cationiques.

Ceci pourrait nous amener à conclure que c'est par un changement d'état physique des lipides qu'agissent les savons cationiques : par exemple une orientation des molécules lipidiques (ainsi que des chaînes protidiques) induite par le saponium (voir p. 42). Cette orientation serait sous la dépendance de forces de Van der Waals, forces considérables comme celles qui s'exercent à l'interface de deux phases. Ces forces seraient capables de décomposer l'édifice lipido-protidique, rendant ainsi possible l'extraction des lipides par l'éther.

c) L'explication de l'existence d'un seuil peut résulter de nos hypothèses précédentes : il s'agit d'expliquer pourquoi les très petites quantités de savons sont encore incapables de détruire les cénapses. L'allure de la courbe fait songer à un brusque retournement de phases, retournement irréversible. La couche hydrophile s'ouvrirait sous l'influence d'une quantité suffisante de savons pour induire une orientation nouvelle des chaînes hydrophobes protidiques et lipidiques (voir p. 35). Peut-être pourrait-on rapprocher ce seuil d'une concentration critique des saponiums en présence des protéines (voir p. 9).

2° RÉPARTITION DES LIPIDES DANS LA PRÉCIPITATION DES PROTÉINES. — L'étude de la précipitation des protéides du sérum nous a montré l'existence d'une petite fraction lipido-sapono-protidique entraînant près de 75 o/o des lipides. Puis lorsque toutes les protéines ont été éliminées par une dose suffisante de saponium, le liquide surnageant renferme encore 25 o/o des lipides à l'état dissous.

Nous voyons que les lipides se sont divisés en deux catégories : la première précipitable, liée à une petite fraction protéinique ; la seconde, non précipitable, par conséquent qui n'est plus liée à des protéines.

A) Quelle relation y a-t-il entre les lipides précipitables et les lipides extractibles par l'éther ?

B) La liaison entre les lipides et les protéines qui précipitent préexiste-t-elle dans le sérum ? Ou bien assistons-nous à la précipitation simultanée de fractions protéiniques et lipidiques indépendantes ?

C) Y a-t-il une différence entre les lipides précipités et les lipides non précipités ? D'où proviennent ces deux fractions ?

Nous allons examiner chacune de ces questions.

A. — *Lipides extractibles et lipides précipitables.* — La comparaison qualitative et quantitative entre les lipides extractibles et les lipides précipitables, montre des différences importantes :

Exprimés en pourcentage par rapport aux lipides du sérum, les résultats sont résumés ci-dessous :

	Lipides totaux	Cholestérol	Phosphore lipidique
Extractibles	40	95 à 100	0
Précipitables	75	80	60

Les lipides ainsi extraits du sérum étant différents, qu'obtiendrait-on en effectuant successivement les deux opérations ? On peut en effet essayer d'extraire d'abord par l'éther les lipides extractibles en présence d'une faible quantité de zéphirol, puis de précipiter par une quantité un peu plus forte de zéphirol les lipides précipitables. La succession des deux opérations, dans cet ordre, ne nous a pas permis d'ajouter leurs effets.

En l'absence des lipides extractibles par l'éther, la première fraction protéinique n'est plus précipitable par le zéphirol. *Ceci nous montre le rôle des lipides dans la précipitation des protéines du sérum par les savons cationiques.*

On peut, inversement, commencer par précipiter le maximum de lipides, puis extraire le sérum restant par l'éther. Dans ces conditions, l'éther n'extraît que des traces de lipides (0,25 mg. par cm³ de sérum : cholestérol 38 µg. phosphore 0). Comme dans le cas précédent, la première opération a pour effet de diminuer le rendement de la seconde.

B. — *Liaison lipides-protéines et décollement des lipides.* — Savoir si l'association des protéines et des lipides précipités dans la première fraction préexiste à l'addition du saponium est un problème difficile à résoudre. Il est d'ailleurs lié à la question du décollement des lipides par les savons cationiques.

L'hypothèse de la précipitation conjuguée de protéines et des lipides préalablement « décollés » pourrait être défendue, puisque nous avons montré qu'un tel entraînement est possible (p. 53).

Mais voici une série d'expériences qui viennent infirmer cette hypothèse :

Etude de la solubilité de la fraction précipitée. — Le précipité saponiolipidoprotéinique (obtenu par 1 mg. de zéphirol par cm³ de sérum) est aisément soluble dans l'eau soit acide (pH 4, au-dessous du pH 5), soit alcaline (pH 10 : cf. la précipitation des protéines du sérum, p. 16). Il peut également être remis en solution dans le sérum surnageant, soit par acidification, soit par alcalinisation (aux pH 4 ou 10) : la précipitation de cette fraction est donc *absolument réversible*. Elle peut même se dissoudre à un pH neutre dans du sérum neuf en quantité suffisante (un volume égal au volume initial du sérum : le zéphirol se trouve en concentration moitié par rapport à la fraction lipidique).

Si notre hypothèse de précipitation semi-indépendante de protéines et de lipides était exacte, nous devrions observer la même réversibilité sur les fractions protéiniques et lipidiques séparées du précipité :

Nous avons délipidé le précipité par des lavages répétés à basse température (— 15° C) avec de l'alcool (3 p.)-éther (7 p.) puis de l'éther. La fraction protéinique se redissout mal dans l'eau : elle a été dénaturée. Quant à la fraction lipidique obtenue après distillation de l'alcool-éther, elle ne se dissout pas dans l'eau : l'émulsion n'est soluble ni dans les solutions acides (ClH à pH < 4), ni alcalines (pH > 10). Ceci nous prouve que dans le précipité total, les lipides se trouvaient liés à des molécules non lipidiques permettant leur solubilisation dans l'eau. De plus, la fraction lipidique isolée ne se dissout pas non plus dans du sérum ni neutre, ni acide, ni alcalin ! Ce n'est donc pas à la faveur de protéines quelconques (et par une liaison réversible) que les lipides du précipité total se dissolvaient dans l'eau : ceci nous montre que la séparation des lipides est devenue irréversible ; *les lipides du précipité étaient donc encore liés à un support non lipidique.*

La même méthode nous a permis d'étendre ce résultat à la fraction lipidique non précipitée.

Deux hypothèses peuvent être envisagées :

1° La liaison entre lipides et protéines précipités préexiste et n'a pas été rompue par le zéphirol.

2° Les lipides n'étaient pas liés aux protéines, mais à un autre support, et précipitent avec la première fraction protéinique.

1. PREMIÈRE HYPOTHÈSE. — La première hypothèse qui pourrait sembler la plus plausible puisqu'elle ne fait intervenir aucun remaniement des cénapses aboutit à la conclusion étonnante que les 3/4 des lipides du sérum seraient liés à une très petite fraction protéinique, le dernier quart (lipides non précipitables) n'étant pas lié à des protéines. Aucune autre méthode de fractionnement des protéines sériques n'a jamais mis en évidence une cénapse représentant

une telle proportion des lipides sériques (251, 255), sauf peut-être les β -lipoprotéines de Cohn (48).

Il faudrait donc admettre ou bien que *cette cénapse est hétérogène vis-à-vis des techniques de fractionnement utilisées antérieurement (aussi bien au sulfate d'ammonium qu'à l'électrophorèse)*, puisqu'elle se répartit entre les diverses globulines et albumines, ou bien que *cette cénapse représente un groupe prosthétique commun aux lipoprotéides du sérum*, qui ne serait détaché ni par le sulfate d'ammonium, ni par l'électrophorèse, mais par les savons.

2° DEUXIÈME HYPOTHÈSE. — On admet le plus généralement que les lipides sont liés aux protéines, d'une part pour expliquer qu'ils ne sont pas directement extractibles par l'éther, d'autre part pour tenir compte du fait qu'ils précipitent avec les protéines par le sulfate d'ammonium ou les autres réactifs défécants. Cependant il faut signaler que cette précipitation n'est pas totale. D'après les récentes recherches de M. Machebœuf, J. Blass et P. Springell (26), il semble qu'une fraction assez importante de lipides échappe à la précipitation par le sulfate d'ammonium à saturation même en milieu acide.

D'autres auteurs ont cru pouvoir isoler d'importantes fractions lipidiques en solution aqueuse après précipitation totale des protéines par d'autres réactifs : S. V. Nedzvetsky en particulier précipite la totalité des protéines du sérum de chien par le sulfate d'argent à l'ébullition et trouve dans le surnageant jusqu'à 75 o/o du cholestérol (295)! Nous avons essayé en vain de reproduire les résultats de Nedzvetsky, tant avec un sérum de cheval qu'avec un sérum de chien : peut-être le sérum utilisé par l'auteur russe était-il spécialement riche en substances capables de solubiliser les stérols (sels biliaires par exemple) ?

Quoi qu'il en soit, il paraît certain qu'une fraction au moins des lipides du sérum est indépendante des protéines. D'ailleurs on pourrait aussi tirer argument du fait de l'inconstance de la teneur en lipides des diverses fractions protéidiques obtenues par des méthodes différentes (108, 116, 251, 255, 282, 406, 430, 435) : si on étudie les lipides liés aux diverses globulines (ou aux albumines), selon qu'elles ont été séparées par précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium ou à l'alcool ou par électrophorèse, on constate des divergences qui pourraient s'expliquer si les lipides n'étaient pas liés aux protéines.

Il est donc possible que la totalité des lipides sériques soit liée à des molécules non protéiniques : par exemple des polypeptides de poids moléculaire peu élevé, ou toute autre molécule non encore identifiée.

Que cette cénapse inconnue soit libre ou liée à des protéines, elle n'est pas scindée par les savons cationiques en l'absence d'éther : en effet le raisonnement que nous avons fait page 57 est toujours

valable. Cette cénapse serait hétérogène vis-à-vis des méthodes de fractionnement du sérum (sulfate d'ammonium, électrophorèse, etc.) : en particulier dans le cas des savons cationiques, elle précipiterait en partie avec le saponium et les protéines, l'autre partie représentant la fraction non précipitable (voir p. 60).

En résumé, si l'état actuel de nos connaissances ne nous permet pas de choisir entre la première ou la deuxième hypothèse nous pouvons cependant tirer les conclusions suivantes, concernant d'une part l'action des saponiums sur ces cénapses, et d'autre part la structure des cénapses du sérum.

1° Les savons cationiques permettent de *séparer les lipides de la masse protéinique du sérum* : mais ils ne les séparent pas d'une petite fraction protéinique à laquelle ils sont attachés ; cette fraction protéinique ne représente que 3 o/o des protéines sériques.

2° Nous avons montré que *le zéphirol, en l'absence d'éther, ne décolle certainement pas les lipides de leur support. Inversement en présence d'éther, nous avons vu que le décollement des lipides insolubles dans l'eau était à peu près total, et que le décollement des phospholipides était possible, mais ne pouvait pas être mis en évidence.*

3° *Ou bien les lipides sont liés à une très petite fraction du sérum (protéiniques ou non), ou bien ils sont attachés aux protéines sous forme d'un groupe prosthétique détachable en bloc par les savons cationiques.*

C. — *Lipides précipitables et lipides non précipitables.* — Les lipides précipitables semblent représenter une fraction bien déterminée des lipides sériques, étant donnée la constance de leur composition par rapport à la précipitation des protéines, en fonction de la quantité de savon cationique ou du pH :

Quantitativement ils forment, comme nous l'avons vu, 75 o/o des lipides totaux, dont 80 o/o du cholestérol et 60 o/o des phospholipides.

Cette quantité, précipitée avec 3 o/o des protéines du sérum, n'augmente pas quand on augmente la quantité de protéines précipitées. Même lorsque la précipitation des protéines est au maximum (voire totale), à pH 10,6, la proportion de cholestérol et de phospholipides précipités est toujours la même.

Ceci nous indique que les lipides non précipitables ne sont pas liés à des protéines de haut poids moléculaire (précipitables) ; mais qu'ils sont soit libres, soit maintenus en solution par le zéphirol, soit liés à des molécules plus petites que les protéines. Ces lipides ont-ils été décollés des protéines par le zéphirol ? ou bien étaient-ils initialement libres ? Cette question nous ramène au problème de l'état des lipides dans le sérum sanguin. Il paraît certain qu'au moins une petite fraction des lipides sériques n'est pas liée à des protéines, mais peut-être

à des polypeptides plus petits ou à d'autres molécules de nature encore indéterminée. Il est donc possible que la fraction lipidique non précipitable par les savons cationiques représente précisément une fraction normalement indépendante des protéines.

Cependant cette fraction lipidique après extraction à l'alcool éther n'est plus soluble dans l'eau : en effet nous avons extrait ces lipides par l'alcool éther et par l'éther comme nous l'avions fait pour la fraction précipitable. L'extrait lipidique total (contenant cependant du zéphirol) n'est plus soluble dans l'eau : ce qui nous prouve qu'il était maintenu en solution par des molécules différents du zéphirol. Il n'est pas non plus soluble dans le sérum : une liaison a donc été irréversiblement rompue par l'alcool éther. Tout ceci nous amène à conclure que *cette fraction lipidique n'est ni libre, ni maintenue en solution par le zéphirol, mais liée à des molécules plus petites que des protéines* (au moins pour une part).

Le zéphirol n'a donc pas décollé ces lipides de leur support. Mais il a peut-être décollé ce support de la masse protéinique du sérum, comme il paraît l'avoir fait également pour la fraction précipitable.

Cette fraction non précipitable est-elle assimilable à la fraction lipidique qui ne précipite pas par le sulfate d'ammonium ? *A priori* c'est peu probable, car ces deux fractions sont différentes, puisque les lipides non précipitables par $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ ne contiennent pas de phospholipides. De plus, l'expérience suivante nous montre qu'il n'en est rien :

Nous avons précipité les lipides de la première fraction en ajoutant au sérum 1,2 mg. de zéphirol par centimètre cube. Puis nous avons précipité les protéines du sérum restant par le sulfate d'ammonium à 0,33 de saturation, puis à 0,50, puis à saturation. Inscrivons pour chaque fraction le taux du cholestérol et le taux du phosphore lipidique :

	Cholestérol	Phosphore lipidique
Précipité par 1,2 mg. de zéphirol . . .	750 µg.	22 µg.
Précipité par 0,33 satur. $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$. . .	75	0
Précipité entre 0,33 et 0,50	100	6
Précipité entre 0,50 et 1	10	6
Résidu non précipité	0	0
Sérum total (1 cm ³)	930	35

Indépendamment des remarques qu'on peut faire sur la répartition des lipides résiduels (le cholestérol accompagne les globulines, les phospholipides se partagent entre globulines et albumines) nous

conclurons que ces lipides, non précipitables par le zéphirol, précipitent par le sulfate d'ammonium.

Y a-t-il entre les lipides précipitables et les lipides non précipitables une différence qualitative? Il ne peut pas y avoir une différence absolue de nature entre les deux fractions lipidiques, puisque le cholestérol, dont la plus grande partie est précipitable, rentre pour une petite part dans la seconde catégorie! Cependant il n'est pas exclu que parmi les phosphatides on trouve des différences entre les deux fractions. Bien qu'on sache effectivement peu de choses sur les phospholipides du sérum, on a souvent remarqué que certaines fractions phosphatidiques (peut-être des acides phosphatidiques et des céphalines à sérine) sont plus fortement liées aux protéines que les autres. Il est possible que ces phosphatides, fortement attachés à leur support, soient en plus grande proportion dans la fraction précipitable.

3° DISCUSSION ET CONCLUSION. — La similitude de comportement, vis-à-vis de l'extraction par l'éther, des savons cationiques et des saponosides cyclo-pentanophénanthréniqes, nous permet de discuter l'hypothèse de la délipidation icéломorphique (voir p. 44). En effet, si on suppose que les saponosides (et les sels biliaires) détachent électivement le cholestérol grâce à leur structure spatiale stérolique, il nous faudrait admettre que nos savons cationiques présentent également cette structure. Nous ne sommes pas opposé à cette manière de voir qui s'accorde avec le comportement des savons avec le cholestérol (voir p. 38). Il est donc tout à fait possible que les chaînes des saponiums se présentent stériquement sous l'aspect polycyclique des stérols. Cependant, il deviendrait aussi logique de prêter la même formule moléculaire aux savons anioniques. Or c'est pour distinguer leur action de celle des saponosides que M. Machebœuf et F. Tayeau ont bâti leur théorie d'icéломorphisme. L'hypothèse perdrait ainsi beaucoup de son intérêt et surtout de son fondement, puisque les savons anioniques se montrent capables de détacher les phosphatides.

Il nous paraît plus plausible d'admettre que les savons tant anioniques que cationiques possèdent effectivement une structure spatiale polycyclique superposable à celle des stérols, et que c'est toujours par adsorption icéломorphique que ces composés viennent s'accoler aux cénapses lipidoprotéiniques. Nous pensons que c'est par une action secondaire sur les lipides que se différencient les divers détergents.

Nous proposons donc le schéma suivant pour expliquer l'action des détergents sur les cénapses lipidoprotéiniques :

En l'absence d'éther, les cénapses ne sont pas dissociables par les détergents : on assiste seulement à la fixation de molécules de détergents sur la micelle lipidoprotéinique, grâce à leur analogie de

chaînes hydrophobes. Ces molécules de détergents par les forces qui s'exercent entre les chaînes hydrophobes, orientent les chaînes lipidiques et protéiniques, opérant ainsi des torsions de la micelle (ou molécule) protéidique (analogie avec la congélation-décongélation).

En présence d'éther, ce solvant s'insinue entre les chaînes hydrophobes des savons et amène un retournement de la micelle autour de gouttelettes d'éther en émulsion dans l'eau : la micelle lipidoprotéinique s'étale à l'interface eau-éther présentant ses pôles hydrophiles vers l'eau et ses chaînes hydrophobes vers l'éther. Les lipides les moins hydrophiles (stérols, graisses neutres...) sont ainsi directement au contact de l'éther. Si le détergent ne s'oppose pas à leur passage dans l'éther, on assiste au décollement de ces lipides. Lorsque le détergent se trouve en excès, il forme avec les stérols une association plus difficilement extractible par l'éther : c'est alors le coefficient de partage du détergent entre l'eau et l'éther qui règle le passage de l'association dans l'éther. Les lipides les plus hydrophiles (phospholipides en particulier) sont plus difficiles à décoller : les forces qui unissent les différentes catégories de lipides aux protéines sont sans doute différentes ; et si certaines substances (alcools, savons anioniques) donnant des complexes peu stables avec les phospholipides, permettent leur décollement par l'éther, les autres (savons cationiques) s'opposeraient au contraire plus énergiquement à leur passage dans l'éther. D'ailleurs, certains phospholipides ont naturellement très peu d'affinité pour l'éther : les sphingomyélines en particulier, qui représenteraient près de 20 o/o des phospholipides du sérum (99).

IV. — APPLICATIONS DE L'ACTION DES SAPONIUMS SUR LES CÉNAPSES A DES PROBLÈMES BIOCHIMIQUES

1° DÉLIPIDATION DU SÉRUM SANGUIN. — Le problème pratique de la délipidation des cénapses se pose perpétuellement au biochimiste. Aucune des méthodes actuellement connues (2, 42, 64, 137, 248, 265, 320, 359) ne donne entièrement satisfaction : en effet elles introduisent toujours des réactifs, dont on n'est pas sûr qu'ils ne modifient pas les protéines. Aussi a-t-on besoin de contrôler les résultats obtenus à l'aide d'un plus grand nombre de méthodes différentes. De plus chaque méthode a un rendement quantitatif et qualitatif différent : il est donc intéressant de trouver des méthodes nouvelles susceptibles d'apporter des résultats nouveaux.

Sur le modèle des méthodes déjà proposées par M. Machebœuf et ses élèves, à l'aide soit de détergents neutres (alcools, acétone, saponosides cyclopentanophénanthréniqes), soit de savons anioniques, nous avons essayé de délipider le sérum sanguin par l'éther en présence de savons cationiques. D'après les résultats obtenus, déjà

exposés pages 44 à 50, nous pouvons préciser la dose optimale de savon cationique et les meilleures conditions de délipidation.

La sapamine MS semble donner d'excellents résultats :

Le sérum est additionné d'une quantité de sapamine comprise entre 1,5 mg. et 3 mg. par centimètre cube de sérum (soit par exemple 2 mg. dans un volume d'eau le plus réduit possible). Le contact avec un volume d'éther suffisant (1 à 5 volumes) est maintenu 24 heures ou mieux 48 heures, au cours desquelles on agite de temps en temps le mélange. Après 48 heures on décante la phase éthérée. Un lavage de la phase aqueuse par un second volume d'éther permet d'éliminer encore des traces de lipides.

Le rendement de cette délipidation est le suivant :

Lipides totaux . . .	40 o/o
Cholestérol . . .	95 à 100 o/o
Phospholipides. . .	0 o/o

Si on utilise un autre savon cationique, il faut chercher la dose optimale :

Zéphirol. .	0,6 à 2,7 mg. par centimètre cube de sérum
Désogène .	0,4 à 0,8 mg. par centimètre cube de sérum

On peut augmenter très légèrement le rendement (de 5 à 10 o/o) en lipides totaux et en phospholipides en incorporant à l'éther 2 à 5 o/o d'alcool éthylique.

Cette méthode aboutit à une délipidation partielle du sérum, mais elle est assez sélective et permet de séparer le cholestérol des phospholipides.

Nous proposons une autre méthode de délipidation fondée sur un principe tout différent : celui de la précipitation des lipides. En effet nous avons vu que les savons cationiques permettent de précipiter 73 o/o des lipides sériques, sans éliminer une trop grande fraction protéinique (3 o/o des protéines sériques). La méthode peut être complétée par une extraction éthérée (selon le principe précédent). Nous avons montré qu'il n'est pas indifférent de commencer par la précipitation ou par l'extraction éthérée : la seule méthode intéressante est la suivante :

On traite le sérum par une quantité de zéphirol correspondant environ à 1,2 mg. de zéphirol par centimètre cube de sérum. Le précipité centrifugé contient 70 à 75 o/o des lipides du sérum (dont 60 o/o du phosphore lipidique). Le sérum surnageant peut alors céder à l'éther (selon la technique décrite plus haut) encore une petite fraction lipidique : le rendement ici encore est amélioré par l'addition d'un certain pourcentage d'alcool dans l'éther.

Ces méthodes de délipidation ne permettent pas une délipidation totale. Cependant il n'est pas impossible que l'on obtienne par une

telle méthode des protéines totalement délipidées, puisque nous avons montré que les lipides qui restent en solution dans le sérum ne sont plus liés à des protéines. Par une méthode de fractionnement des protéines, peut-être aura-t-on le moyen d'isoler des fractions protéiniques bien délipidées.

Nous avons essayé en particulier de précipiter par le sulfate d'ammonium les protéines du sérum ainsi partiellement délipidé (voir p. 60); mais dans ces conditions, les fractions globuliniques et albuminiques obtenues entraînent encore la fraction lipidique restante.

On pourra sans doute appliquer ces méthodes de délipidation à d'autres cénapses que le sérum sanguin (cénapses endocellulaires, cénapses du lait, etc...). Dans chaque cas, il conviendra de chercher les conditions optimales : dose de saponium, pH , concentration saline.

2° PRÉPARATION DE FRACTIONS RICHES EN LIPIDES. — L'isolement de fraction lipidoprotéiniques naturelles riches en lipides se heurte souvent à des difficultés soit pour dissoudre ces cénapses soit pour les séparer des autres protéines. Il n'existe aucune méthode générale pour isoler les cénapses lipidoprotéiniques.

Les détergents semblent des réactifs spécialement adaptés à cet usage. La principale objection qu'on peut faire à leur emploi provient du fait qu'ils sont susceptibles de dénaturer les protéines.

Nos recherches sur la précipitation des protéines et des lipides du sérum par les saponiums nous ont montré qu'il est possible de séparer des cénapses très riches en lipides du reste des protéines du sérum. Malheureusement c'est sous la forme de complexes triples : protéine-lipides-saponium qu'on isole ces cénapses. L'élimination du saponium est un problème difficile à résoudre : si nous l'extrayons par l'éther en milieu alcalin, une partie importante des lipides peut être entraînée également; par les réactifs précipitants, on peut entraîner également des protéines et des lipides !

Nous avons cependant obtenu un résultat intéressant dans l'étude d'une cénapse particulière :

Il s'agit d'une fraction protéidique extraite d'un cestode (*Tenia saginata*). Cette fraction, isolée par M. Machebœuf et N. Kent, était insoluble dans l'eau et dans les solutions salines quel que soit le pH . Seul l'acide chlorhydrique dilué était capable d'en fournir une suspension colloïdale. L'analyse a montré que c'était une cénapse protéine-cérébrosides.

L'addition de zéphirol à la suspension acide permet la solubilisation de cette cénapse :

5 mg. de cette fraction sont mis en suspension dans 5 cm³ d'eau + 0,6 cm³ d'acide chlorhydrique $n/10$. On ajoute 1 mg. de zéphirol

(0,1 cm³ de solution à 1 o/o). La dissolution s'effectue lentement : elle est accélérée par le chauffage de la solution.

La nature de l'acide est importante : de même que dans le cas des cérébrosides isolés (voir p. 43), les acides chlorhydrique et phosphorique permettent une bonne dissolution, tandis que les acides sulfurique, nitrique ou acétique ne le permettent pas.

Nous avons pu grâce à cette solubilisation estimer le pH isoélectrique de la cénapse : la solution acide obtenue plus haut peut être neutralisée par des quantités croissantes de soude $n/10$; à partir de pH 4,2-4,4 la cénapse précipite avec le zéphirol. On peut également déterminer ce point d'une autre façon : la suspension colloïdale obtenue en l'absence de zéphirol, centrifugée, fournit une solution très diluée, trouble. Portée à des pH croissants par addition de soude $n/10$, la solution floccule au voisinage de pH 4,2 (de pH 4,1 à pH 4,5) et ne floccule pas en milieu plus alcalin. L'addition de très petites quantités de zéphirol (une goutte de solution à 1 o/o) montre une précipitation dans les tubes de pH $> 4,2$.

Nous pouvons donc conclure que le pH isoélectrique de la cénapse cérébrosidoprotéinique isolée du cestode est voisin de 4,2 ; ce résultat doit être accepté avec les réserves que nous avons faites au chapitre I, page 13.

En conclusion, les savons cationiques peuvent être des réactifs très utiles dans l'étude des cénapses lipidoprotéiques, endocellulaires, permettant leur solubilisation ou leur précipitation.

IV. — ACTION DES SAVONS A CATION ACTIF SUR LES CÉNAPSES « IN VIVO ». ACTION SUR LA CELLULE

Les propriétés antibiotiques des savons cationiques nous fournissent l'exemple d'une action complexe sur la cellule entière. Elles nous posent un problème délicat : par quel mécanisme le savon inhibe-t-il la vie de la cellule ?

Des hypothèses ont déjà été formulées à ce sujet, R. D. Hotchkiss (159) discerne plusieurs stades dans l'action des savons sur la cellule : en premier lieu, les ions gras se fixeraient sur la membrane cellulaire. Puis ils la détérioreraient irréversiblement. Alors se produirait la lyse de la cellule (lyse passive ou active — autolyse). Le contenu cellulaire serait détruit ; et le métabolisme cellulaire s'arrêterait définitivement.

Nous classerons nos recherches expérimentales sur ce sujet d'après l'ordre précédent : action des saponiums sur la membrane cellulaire,

puis sur la lyse du contenu cellulaire et enfin sur les systèmes enzymatiques du métabolisme cellulaire.

Partout nous retrouvons l'action des saponiums sur les cénapses protéido-lipidiques.

1° ACTION SUR LA MEMBRANE. LYSE

La cytolysé représente une manifestation visible d'une altération de la paroi (membrane) cellulaire. Mais toute altération de la « membrane » ne s'accompagne pas nécessairement de lyse. La lyse apparaît donc comme secondaire à une action sur la « membrane ».

Nous avons observé divers stades dans la lyse par les saponiums de cellules végétales (germination du cresson alénois), de corps bactériens et de globules rouges. Il est évident que des distinctions doivent être faites selon la nature et la constitution de la « membrane cellulaire », une cellule bactérienne à capsule glucidolipidique diffère de ce point de vue d'une cellule animale ; l'architecture cytoplasmique limitant les cellules animales, quoique peu connue (52, 53, 57, 68, 123, 144, 316, 329, 428), montre cependant des variations importantes selon qu'on s'adresse par exemple, à un leucocyte ou à une hématie. Les globules rouges sont un matériel commode : on les obtient facilement et l'hémolyse est directement mesurable par la diffusion de l'hémoglobine dans le milieu. Mais le cytoplasme du globule rouge est assez spécial : de nature lipoprotéidique, il constitue une armature (stroma) emprisonnant l'hémoglobine et d'autres substances solubles.

L'étude de l'hémolyse dérive donc directement de l'étude que nous avons faite précédemment : action sur les protéides, les lipides et les cénapses lipidoprotéiques. Le mécanisme de l'hémolyse a intéressé de nombreux chercheurs, et la discussion n'est pas close : il est possible que ce mécanisme soit différent selon les agents hémolytiques utilisés. Parmi ceux-ci les détergents possèdent une certaine homogénéité de propriétés ; l'hémolyse par les détergents anioniques (savons, sels biliaires, etc.), connue depuis longtemps, a fait l'objet d'un très grand nombre de travaux (¹). Il était utile de les reprendre pour les savons cationiques.

Hémolyse par les saponiums. — Les globules utilisés provenaient soit de sang de cheval, soit de sang de mouton, simplement défibriné par agitation avec des billes de verre. Isolés par centrifugation, ils

(¹) La lysocithine (63, 124) est un détergent amphotère, qu'on peut ici rapprocher des détergents cationiques.

étaient lavés par plusieurs suspensions dans l'eau salée à 9 0/00 et centrifugations (5 à 10 fois). Au moment de l'emploi, ils étaient mis en suspension dans deux cents volumes d'eau salée isotonique.

L'hémolyse fut toujours menée à la température du laboratoire (18° à 20°) et effectuée sur $0,5 \text{ cm}^3$ de suspension globulaire, à laquelle on ajoute $0,2 \text{ cm}^3$ de solution de détergent.

Les divers savons cationiques que nous avons étudiés se sont tous montrés des hémolytiques puissants (de l'ordre de 10^9 molécules pour un globule rouge, alors que saponosides et oléate de sodium ne sont actifs qu'à une dose voisine de 10^{10} molécules). Mais le pouvoir hémolytique n'est pas le même pour tous.

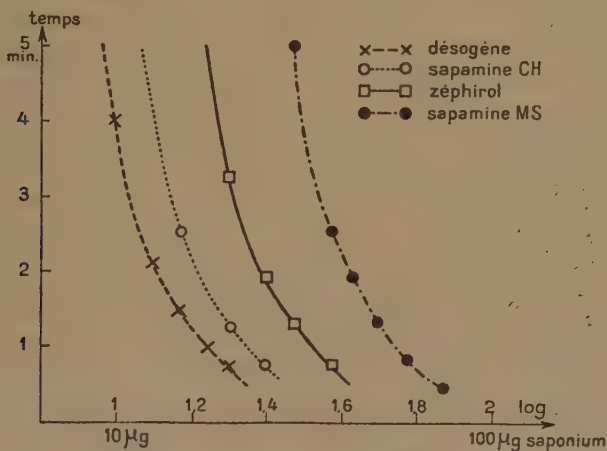


Fig. 25. — Hémolyse par divers saponiums.

Ordonnées : temps nécessaire pour obtenir la lyse de $0,5 \text{ ml.}$ de suspension globulaire à $1/200$.

Abscisses logarithmiques : dose de saponium.

Nous pouvons représenter les résultats graphiquement. On constate que les courbes obtenues sont superposables si on prend une échelle d'abscisses logarithmiques, [ou avec les unités suivantes :

Zéphirol 100 ; sapamine MS 170 ; désogène 54 ; sapamine CH 67.

La courbe du zéphirol suffit alors pour représenter les 4 courbes précédentes].

Ces rapports diffèrent des rapports des poids moléculaires. En prenant toujours pour unité arbitraire 100 pour le zéphirol, le tableau est le suivant :

Nombres correspondant à	Poids moléculaires	Poids équivalents pour l'hémolyse
Zéphirol	100	100
Sapamine MS.	150	170
Désogène	135	54
Sapamine CH.	123	67

Inhibiteurs de l'hémolyse. — Avant de discuter le mécanisme de l'hémolyse, nous avons étudié l'action inhibitrice de certaines substances dont on sait déjà qu'elles peuvent être antihémolytiques : protéines (31, 330), phosphatides (47, 230) et surtout cholestérol (47, 330, 349). Toutes ces substances sont capables de ralentir l'hémolyse par certains agents hémolytiques. Cette action antihémolytique nous intéresse ici par les renseignements qu'elle nous donne sur les interactions lipides (ou protéines) et savons cationiques.

Nos résultats ont été publiés (324). Résumons-les ici.

La lécithine retarde l'hémolyse, mais ne semble pas capable de l'inhiber totalement.

Seul parmi les substances essayées, le cholestérol s'est montré vraiment actif comme inhibiteur de l'hémolyse par les savons cationiques : il permet en effet d'empêcher complètement la lyse.

1) Tant que la quantité de cholestérol est inférieure à une certaine dose limite, il y a lyse, plus ou moins retardée. Dès que la dose limite est atteinte, il n'y a plus de lyse.

2) Cette dose limite correspond approximativement à une molécule de cholestérol pour une molécule de saponium (pour le zéphirol ou la sapamine MS) et à deux molécules de cholestérol pour une molécule de désogène (1).

3) On observe en outre un *phénomène de floculation* des hématies dans une certaine zone de concentration de l'émulsion saponium + cholestérol. Cette floculation représente même une *agglutination instantanée* pour une dose optimale du mélange.

Pour expliquer le mécanisme de l'agglutination, nous rapprocherons ces observations des expériences faites précédemment (p. 53) sur la précipitation des protéines diluées en présence de cholestérol : nous avons constaté qu'une floculation instantanée apparaissait dans la zone de concentration relative en saponium correspondant à la précipitation de l'albumine concentrée, alors qu'en l'absence de cholestérol, seul un trouble manifestait la réaction. L'explication que nous avons fournie, est encore valable dans le cas des hématies : c'est la floculation des stromas qui est accélérée par le cholestérol. D'ailleurs, en l'absence de cholestérol, on constate que les stromas lysés floculent lentement dans la même zone de concentration en

saponium. Nous sommes donc en droit d'interpréter cette agglutination comme une accélération par le cholestérol d'une précipitation des stromas par les saponiums.

Le cholestérol a une double action :

1° il empêche la lyse, sans doute par la formation du complexe saponium-cholestérol. Celui-ci ne serait plus capable de s'insinuer dans l'hématie et de dissocier la membrane ;

2° il s'associe à la combinaison saponium-stroma soluble et accélère sa floculation : il permet ainsi une agglutination des globules non lysés ⁽¹⁾ ⁽²⁾.

La sérum-albumine (cristallisée) n'est antihémolytique qu'à dose élevée (au moins dix fois le poids de sapamine MS). De plus, cette action est seulement un retard à l'hémolyse, car même de très fortes doses d'albumine (40 mg. pour 0,2 mg. de sapamine) sont incapables d'empêcher *totalement* l'hémolyse de 0,5 cm³ de suspension globulaire à 1/200).

Les globulines du sérum inhibent l'hémolyse mieux que la sérum-albumine cristallisée : leur pouvoir antihémolytique observé au bout d'une heure correspond à 5 mg. de globulines pour 0,1 cm³ de sapamine à 2 0/0 ; au bout de 8 heures il faut 15 mg. de globulines.

Les cénapses lipoprotéidiques acidoprécipitables de Machebœuf, riches en lipides (albumine contenant 22 0/0 de lipides) se sont montrées encore plus actives que les globulines pour retarder l'hémolyse (3,3 mg. au bout d'une 1/2 heure ; 4 à 5 mg. après 8 heures).

Ce retard à l'hémolyse semble ainsi lié à une plus ou moins grande richesse en lipides (lécithine et cholestérol) : le pouvoir antihémolytique des cénapses pourrait être presque entièrement expliqué par celui des lipides qu'elles renferment.

Sérum ou plasma donnent des résultats analogues. Ils provoquent un retard à l'hémolyse nettement plus marqué que celui dû à la sérum-albumine seule.

Le pouvoir antihémolytique du sérum peut donc pour une grande part être dû au cholestérol qu'il contient.

Mais ceci est insuffisant : *le pouvoir antihémolytique du sérum est supérieur à celui du cholestérol qu'il renferme.* Les protéines

(¹) Lorsque les globules ne sont pas agglutinés, le cholestérol n'inhibe pas indéfiniment la lyse : après 24 ou 48 heures de contact, on constate une lyse plus ou moins importante. Au contraire, les globules agglutinés résistent beaucoup mieux à l'action lytique du saponium.

(²) Retenons de ces résultats la relation qui existe ici entre *un agent lytique et un agent agglutinant*. On sait en effet combien proches parentes sont les hémolysines et les hémagglutinines naturelles ou anticorps. Il nous paraît intéressant de constater qu'ici la simple addition de cholestérol semble transformer un pouvoir hémolytique en un pouvoir hémagglutinant. N'existe-il pas dans certains cas une telle relation entre lysines et agglutinines naturelles ?

jouent également un rôle important. En effet, si on calcule la part qui revient à chacun des constituants du sérum, les protéines, bien que moins puissantes, ont, du fait de leur importante concentration, près de la moitié du pouvoir antihémolytique du sérum.

Les travaux de E. Ponder (331) sur l'hémolyse par les savons anioniques aboutissent à une conclusion du même ordre.

Mécanisme de l'hémolyse par les saponiums. — Sans vouloir reprendre ici une discussion déjà ancienne sur le mécanisme de l'hémolyse, nous avons cependant cherché si l'hémolyse par les savons cationiques était du même type que l'hémolyse par les autres détergents. Les doses lytiques sont du même ordre de grandeur. Les inhibiteurs sont les mêmes à très peu près. Observée microscopiquement entre lame et lamelle, l'hémolyse ne se produit ni par émission de pseudopodes myéliniques comme avec les agents gonflants, lyotropiques : perchlorate ou thiocyanate de lithium (113), ni par éclatement des stromas comme par les solutions anisotoniques (358, 426, 427). Elle fournit au contraire des images de globules sphériques, s'hypertrophiant progressivement. Au fur et à mesure qu'on augmente la dose de saponium, à partir d'une dose plus de 10 fois inférieure à la dose lytique, la taille des globules augmente. Puis les globules gonflés deviennent coalescents et fusionnent comme un coacervat ; la lyse est enfin complète pour les fortes doses de saponium.

Ce fusionnement de globules fait aussitôt songer aux observations étonnantes de D. Dervichian et C. Magnant (71) sur les coacervats formés d'hémoglobine, de nucléinate de sodium et de savon cationique (mirystylcholine) : ces composés forment des globules se comportant physicochimiquement comme des hématies ; la seule différence consiste dans l'absence d'une membrane, ce qui permet aux globules de fusionner. Les saponiums ont donc eu pour effet de transformer les hématies en globules coacervés analogues aux globules synthétiques de D. Dervichian et C. Magnant. Les saponiums ont exercé leur action dissolvante sur la membrane et se sont combinés au contenu cellulaire lui-même.

C'est la chaîne grasse qui est la principale responsable de l'action hémolytique : si nous prenons en effet à doses équimoléculaires le zéphirool et le chlorure de benzyléthyl diméthylammonium (cf. p. 49), ce dernier ne provoque aucune hémolyse visible même après 24 heures à la température ordinaire. Même à une dose beaucoup supérieure (6 mg.), le dérivé ammonium sans chaîne grasse n'est pas hémolytique dans les conditions précédentes.

On sait que les ammoniums sont considérés comme hémolytiques (93, 129). Mais ce sont des hémolytiques beaucoup moins puissants. On a montré que ces composés étaient hémolytiques dans la

mesure où ils pouvaient prendre une forme non dissociée (171, 172, 173). Dans cet ordre d'idées, nous avons constaté que la sapamine CH (amine tertiaire) était deux fois plus active que la sapamine MS (amine quaternaire possédant la même chaîne grasse) : si la chaîne grasse joue le rôle principal dans l'hémolyse sur les saponiums, la fonction amine joue aussi un rôle important.

Nous avons vérifié une fois de plus que l'hémolyse n'était pas le fait d'un simple abaissement de tension superficielle : 1 cm³ de suspension globulaire est hémolysé instantanément par 0,15 mg. de zéphirol, alors que 10 mg. d'émulphor o (détergent non ionique) sont totalement inactifs. Les tensions superficielles étaient cependant également abaissées (mesurées au compte-gouttes par le nombre de gouttes contenues dans 1 cm³) :

1 cm ³ de suspension globulaire.	T. S. 26 gouttes
1 cm ³ + 0,15 mg. de zéphirol	T. S. 42 gouttes
1 cm ³ + 10 mg. émuphor o.	T. S. 42 gouttes

Nous concluons comme E. Ponder (331) que les détergents cationiques, comme les détergents anioniques, agissent sur le système soit des lipides, soit des protéines, soit des cénapses lipidoprotéiniques, et comme D. Dervichian (71) que cette action s'exerce non seulement sur la « membrane » mais aussi sur le contenu cellulaire lui-même.

Est-il possible de préciser un peu cette action ? S'agit-il d'une dissolution des phospholipides par les saponiums ? D'une formation de complexes avec le cholestérol ? S'agit-il d'un effet sur les protéines ? Ou enfin s'agit-il du décollement de la liaison protéine-lipides ?

La comparaison des divers savons cationiques étudiés peut nous apporter des arguments appuyant telle ou telle hypothèse puisqu'ils diffèrent dans leur action quantitative sur ces divers constituants cellulaires :

Si le zéphirol et la sapamine MS sont capables de former des complexes émulsionnant le cholestérol, le désogène est nettement moins actif. Cependant l'inhibition de l'hémolyse par le cholestérol fournit des chiffres différents : les deux premiers saponiums sont neutralisés par une molécule de cholestérol alors que le désogène en nécessite deux. L'action sur les protéines s'effectue avec des coefficients différents. De même la délipidation, etc... Représentons les différentes activités des savons cationiques par des nombres correspondant à la dose du saponium équivalente à 100 de zéphirol (voir p. 12, 20, 21, 40, 50, 68).

Alors que la sapamine et le zéphirol se comportent toujours de façon à peu près équimoléculaire, le désogène a une action différente suivant qu'il s'agit d'une action sur les protéines (sérum-albumine, fin de précipitation du sérum), ou sur les lipides, ou sur les cénapses

	Poids molé- culaire	Dissol. léci- thine	Choles- téról anti- hémoly- tique	Délipi- dation par l'éther	Préci- pité de sérum- albu- mine	(m) Début de précipi- tation du sérum	(g) Fin de précipi- tation du sérum	Hémo- lyse
Zéphirol .	100	100	100	100	100	100	100	100
Sapamine	150	160	150	170	157	160	150	170
MS .	135	70	65	54	109	60	130	54
Désogène.								

lipidoprotéiniques (délipidation, début de précipitation du sérum). De la comparaison avec l'hémolyse il ressort que celle-ci s'apparente nettement à l'action sur les cénapses lipidoprotéiniques et non à l'action sur les protéines.

D'ailleurs la comparaison avec les autres détergents hémolytiques (savons anioniques, sels biliaires, saponosides stéroliques) est en faveur de cette hypothèse, puisque tous manifestent cette action sur les cénapses. Nous avons montré que les détergents ne rompent pas les liaisons lipides-protéines, mais s'insinuent dans les cénapses, en modifiant la forme et la stabilité, et favorisent ainsi le décollement par l'éther. Dans le cas de l'hématie, la structure lipidoprotéinique de la membrane permet une infiltration analogue des savons. Cette infiltration a pour effet de modifier considérablement la perméabilité de la cellule qui se gonfle d'eau et permet la lyse. Les effets secondaires du saponium peuvent alors se manifester : dissolution des protéines et des lipides du stroma, formation de coacervat avec le contenu de l'hématie, dissolution de ce coacervat, combinaisons insolubles avec les protéines du stroma, etc...

Action sur la membrane cellulaire. — La théorie que nous venons de développer sur l'action des saponiums sur l'hématie est fondée sur une action d'infiltration de la membrane par les saponiums, précédant la lyse. Dans certains cas la lyse ne se produit pas : en particulier dans le cas de l'agglutination en présence de cholestérol ; la fixation du saponium sur la membrane existe toujours, mais sans doute se fait-elle alors différemment. Elle correspond alors aux combinaisons déjà étudiées des saponiums avec les protéines (¹), ou avec les acides nucléiques.

(¹) E. Valko et D. Diblee (411) ont mis en évidence une adsorption des savons cationiques par les corps bactériens, et Mc Calla (246) l'assimile à l'adsorption des cations.

E. G. Klarmann et E. S. Wright (196) montrent une agglutination des bactéries par les saponiums.

Ainsi nous distinguons deux sortes d'action sur la membrane cellulaire : l'infiltration qui aboutit à la lyse, et la fixation sur les protéines et acides nucléiques, qui amène une précipitation, une agglutination des cellules.

Nous avons retrouvé ces deux effets dans l'action des saponiums sur les bactéries (323) : il est aisé de les dissocier, car *c'est dans une zone de concentration relativement étroite qu'on observe la lyse ou l'agglutination*. La fixation des saponiums s'accompagne également d'une « négativation » du « Gram », phénomènes déjà observés pour d'autres détergents (anions biliaires par exemple (149, 188, 310, 311)) et dont la signification n'a pas encore été éclaircie (149, 310, 311, 387). La colorabilité des bactéries par la méthode de Gram est certainement liée à des états différents de la membrane bactérienne, et la classification des bactéries en Gram + et Gram — correspond à des différences de comportement vis-à-vis de certains antibiotiques : rappelons en particulier que les détergents anioniques sont bien plus actifs sur les bactéries Gram + que sur les bactéries Gram — (12, 24, 50, 84). Si la substance colorable est ribonucléoprotéinique, il est possible que la fixation des saponiums sur l'acide ribonucléique explique la négativation du Gram.

La cytolyse, la négativation du Gram et la disparition des ondes moirées pour les pneumocoques, sont autant de manifestations visibles, et sans doute secondaires, de cette action des saponiums sur la membrane.

La lyse semble mettre en jeu des processus très variés, et nous pouvons dire qu'il ne s'agit pas d'un phénomène unique mais qu'il existe plusieurs sortes de lyse.

Nous avons jusqu'ici estimé la lyse par la disparition à l'œil (ou au microscope) des corps cellulaires, appelant lyse totale la disparition complète et lyse partielle la diminution apparente de l'opacité des suspensions. Mais lorsque nous prenons un test chimique les résultats sont tout différents : suivons en effet le passage dans le milieu extérieur d'un constituant de la cellule facilement dosable comme l'ion phosphate par exemple, nous constatons alors que dans la zone où la lyse est inapparente, l'ion phosphate a diffusé comme si la cellule était totalement lysée. Seul le squelette cellulaire semble intact et pourrait laisser croire à une absence de lyse.

Donnons l'exemple d'une telle action du zéphirol sur un germe dont la lyse n'est pas directement visible : *Clostridium sporogenes*. A 5 cm³ de suspension (6 mg. de germes lavés par cm³) on a ajouté des quantités croissantes de zéphirol. Après un séjour d'une heure à 37°, les suspensions sont centrifugées. Une partie aliquote du surnageant (2/5) est précipitée par l'acide trichloracétique (4 cm³ à 20 o/o) qui élimine le zéphirol en excès dans le milieu. Puis on filtre et on dose dans le filtrat le phosphore minéral par la méthode colorimé-

trique de Machebœuf et Delsal (257). Les résultats montrent une action lytique nette à partir de 200 à 400 $\mu\text{g.}$ de zéphirol, soit une dose de 7 à 13 $\mu\text{g.}$ par milligramme de germe (analogue à la dose hémolytique).

Zéphirol en mg . .	0	0,1	0,2	0,4	1,0	2,0	3,0	4,0
Phosphore en $\mu\text{g.}$.	1	3	13	20	22	22	18	18

Les ions et molécules diffusibles sont passés dans le milieu. Les germes sont tués. Il y a dans ce cas modification de la perméabilité cellulaire (1).

Ceci nous amène à distinguer deux sortes de lyses : la lyse par diffusion des constituants solubles de la cellule et la lyse par dissolution totale du squelette cellulaire. La première semble liée à une modification de la perméabilité de la membrane et représente la forme la plus générale de la lyse cellulaire. La seconde ne s'observe qu'exceptionnellement, dans une zone étroite de concentration et pour des espèces cellulaires particulières : *Pneumococcus* par exemple, ou *Glaucoma piriformis*.

L'hémolyse par des agents autres que les saponiums se rattache en général à la première sorte de lyse : le stroma se vide de son contenu, laissant une enveloppe insoluble, et l'hémoglobine fournit une mesure directe facile de la diffusion des constituants cellulaires. Cependant dans le cas de l'hémolyse par les savons cationiques, le stroma n'échappe pas à l'action de ces réactifs, et l'hémolyse peut se ranger dans la deuxième catégorie de lyse. Dans un certain domaine de concentration en saponium, nous avons observé une sorte de dissolution totale de l'hématie. Dans une autre zone de concentration, on observe la *précipitation des protéines du stroma* par les saponiums pour un rapport saponium/protéines correspondant à l'action du savon sur les protéines ; dans ce cas, la lyse semble être du premier type puisqu'elle laisse flocculer les stromas.

Rappelons que, dans ce dernier cas, le *cholestérol* ajouté au saponium nous a permis d'empêcher l'hémolyse et d'observer ainsi l'action précipitante des saponiums sur les protéines des stromas.

Le cholestérol inhibe également la lyse des bactéries :

Le cholestérol n'empêche pas la fixation du saponium sur la membrane cellulaire, mais entrave peut-être son infiltration à l'intérieur de la cellule. Nos expériences confirment ainsi la théorie de Schulman (367) sur la lyse et l'agglutination.

(1) L'augmentation de perméabilité cellulaire par les détergents (détergents anioniques comme le Duponol) a déjà été utilisée pour favoriser l'introduction de médicaments dans les cellules (27).

2° ACTION DES SAPONIUMS SUR LES ENZYMES

Le saponium ne limite pas son action à la surface de la cellule. Il pénètre dans toutes les parties de la cellule (92, 215). Les ravages qu'il exerce sur les différents systèmes enzymatiques, selon la dose mise en œuvre, expliquent ses actions bactériostatique, bactéricide, voire bactériolytique.

L'action des saponiums à l'intérieur de la cellule peut porter soit sur les protéines (précipitation ou dénaturation) (5, 103), soit sur les lipides (décollement ou émulsification), soit sur les acides nucléiques (combinaison insoluble) (p. 39 et 36). Elle peut surtout modifier les relations qui existent entre ces éléments : par dissociation ou réarrangement de cénapses lipido-protéiniques (p. 61 et 59), nucléo-protéinique, chrome-protéinique (211, 215).

Une telle discussion n'aura d'intérêt que lorsqu'on connaîtra la structure des systèmes enzymatiques de la cellule et qu'on aura pu mesurer l'activité des saponiums sur ces différents systèmes.

Si l'action bactériostatique reste encore mal expliquée (peut-être par interférence du saponium avec un système nécessaire à la division cellulaire ?), l'action bactéricide a fait l'objet de nombreuses hypothèses : pour certains, c'est simplement la perméabilisation de la membrane qui entraîne la mort par suite de la diffusion d'éléments indispensables (coenzymes, ions...) (159-160). Pour d'autres, l'inhibition d'enzymes importants est le facteur essentiel (130, 356).

Il est donc utile d'étudier l'action des saponiums sur les différentes activités diastasiques d'une cellule pour pouvoir élucider l'action antibiotique de ces corps. D'autre part, comme il est vraisemblable que la majorité des enzymes fait partie de cénapses, *in vivo*, nous croyons que cette étude a sa place dans celle que nous avons entreprise de l'action des saponiums sur les cénapses, et qu'en tout cas, elle en représente une application très importante.

On sait déjà que les détergents peuvent mettre en solution des protéines insolubles, qu'ils émulsionnent les lipides, qu'ils bouleversent les cénapses. Par ailleurs, ils sont capables de précipiter des fractions inactives ou inhibitrices. Ils permettent de séparer des fractions protéiques, etc... Toutes ces propriétés des saponiums en font des réactifs extrêmement intéressants pour l'étude des enzymes.

1° *Xanthine déshydrase*. — Le xanthine déshydrase existe dans le lait sous forme d'une cénapse lipidique : on sait en effet que cette diastase est attachée aux globules de crème ; le lactosérum est beaucoup moins actif que le lait entier. Quelle est donc l'action d'un saponium sur ce système ?

Si nous ajoutons du zéphirol ou de la sapamine MS au lait entier,

on constate que l'activité xanthine-déhydrasique est considérablement augmentée ⁽¹⁾.

Les mesures sont faites en ajoutant au lait (2 cm³) de l'hypoxanthine (0,1 cm³ de solution M/20 dans NaOH n/20), du bleu de méthylène (0,1 cm³ M/80) et en complétant à 3 cm³ par de l'eau lactosée à 4 o/o. Une couche d'huile de paraffine évite l'oxydation du leucodérivé et les tubes sont placés à 37° C. Le temps au bout duquel le bleu est décoloré sert à caractériser l'activité déhydrasique.

Exemple :

Lait fraîchement trait.	.	.	.	.	.	28 minutes
Lait + sapamine MS à 1 o/o	0,1 cm ³ .	.	.	.	.	5 1/4 minutes
Lait + »	0,2 cm ³ .	.	.	.	.	4 1/2 »
Lait + »	0,5 cm ³ .	.	.	.	.	4 »
Lait + »	1 cm ³ .	.	.	.	.	3 3/4 »
Lait + zéphirol à 1 o/o	1 cm ³ .	.	.	.	.	7 »

Si on commence par décanter la crème par centrifugation poussée, le lac'oplasma a une activité très faible (le bleu ne se décolore pas) et n'est que très peu activé par la sapamine. Toute l'activité enzymatique du lait se retrouve au contraire dans l'émulsion de la crème, et le saponium ajouté active cette émulsion comme le lait initial. On peut centrifuger et décanter la crème ainsi traitée : l'activité reste alors dans la phase aqueuse. Il résulte de ces expériences que l'enzyme est initialement lié aux globules lipidiques et que le traitement par le saponium a pour effet de libérer certaines liaisons, et rend l'enzyme soluble dans l'eau. Le saponium n'exerce pas une action activatrice spécifique sur la xanthine déhydrase : en effet, comme nous l'avons montré avec E. Neuzil et L. Baudu (327, 328), le refroidissement du lait (à la glacière par exemple) a un effet sensiblement équivalent à l'addition de sapamine MS. Il s'agit donc d'une action physico-chimique provoquant un éclatement du globule de crème. Nous avons déjà eu l'occasion (p. 55) de rapprocher l'action du froid et des saponiums dans la décomposition des cénapses lipidoprotéiniques.

En conclusion, nous avons constaté que les saponiums n'inhibent pas l'activité de la xanthine déhydrase. Ils activent les préparations en dissociant l'enzyme de son support lipidique qui l'inhibe. Au point de vue pratique, les saponiums peuvent donc servir à isoler ou purifier cet enzyme et se montrent des réactifs nouveaux très utiles pour l'étude des systèmes diastasiques constitués par des cénapses.

2° *Laccase* (Mesures effectuées avec l'appareil de Warburg sur l'hydroquinone à pH 6,35 ⁽²⁾). — Des préparations laccasiques d'arbre

(1) Cette étude a été menée en collaboration avec mon père M. Polonovski et ses élèves E. Neuzil et L. Baudu (328) à qui nous redisons ici un très amical remerciement.

(2) Cette étude des oxydases (laccase, cytochrome oxydase, catéchol-oxydase, acide ascorbique oxydase) a été faite en collaboration avec notre ami Didier Bertrand (23), à qui nous adressons nos vifs remerciements.

à laque, purifiées par précipitation alcoolique fractionnée, ont été additionnées de sapamine, jusqu'à 30 à 40 mg. de sapamine par centimètre cube de préparation laccasique (extrait sec 23 mg./cm³). Un abondant précipité entraîne des gommages inactives. Le liquide surnageant conserve la totalité du pouvoir oxydasiques. Après dialyse la solution finale est même plus active que la préparation initiale. Les résultats sont les mêmes lorsqu'on opère la précipitation en présence d'un tampon phosphaté M/20, à divers pH.

Solution	Initiale	Finale	Rapport $\frac{\text{finale}}{\text{initiale}}$
Activité totale (absorption d'O ₂ en mm ³ /heure	11 550	16 000	1,385
Q _{O₂}	182	3 920	21,4

- 1° La sapamine n'inhibe donc pas la laccase ;
- 2° Elle ne précipite entre pH 5,5 et pH 9 que des substances inactives ;
- 3° Elle semble même activer la préparation (peut-être par élimination d'inhibiteurs) ;
- 4° Le phénomène est le même dans un large domaine de pH (de 5,5 à 9) ;
- 5° La présence de sels ne modifie pas le phénomène ;
- 6° Enfin la stabilité de la diastase purifiée par la sapamine s'est montrée remarquable ; la préparation finale non dialysée s'est en effet conservée à pH 8,75 sans perte d'activité plusieurs mois à la glacière, alors que jusqu'ici toutes les préparations de laccase devenaient très rapidement inactives dès qu'elles étaient tamponnées à pH 8. (Cette stabilité semble un peu moins bonne en l'absence de sels).

L'emploi de la sapamine permet donc une excellente purification de la laccase.

3° *Catéchoxydase* (Mesures effectuées avec l'appareil de Warburg sur le pyrocatéchol à pH 7,3 avec absorption du CO₂, sur le paracrésol à pH 6,3 et absorption du CO₂, sur l'hydroquinone à pH 6,3). — Une préparation extraite du champignon de couche (*Psalliota campestris* var. *hortensis*), obtenue par précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium et dialysée, nous a permis d'étudier l'action de la sapamine sur les trois activités oxydasiques suivantes : catéchoxydasique, paracrésolasique et laccasique. La solution initiale (extrait sec 0,6 mg./cm³) ne précipite pas par l'addition de sapamine quel que soit le pH (jusqu'à 10).

A 0,5 cm³ de cette solution diastasique (initiale C), nous avons

ajouté 0,2 cm³ de solution à 10 o/o de sapamine MS et 0,3 cm³ de solution tampon phosphatée M/5 à pH 7,3. La solution finale (D₁) fournit les chiffres d'activité suivants :

Solution	Initiale	Finale	Rapport
Qo ₂ pyrocatéchol	6 000	6 810	1,135
Qo ₂ paracrésol	2 730	2 970	1,05
Qo ₂ hydroquinone.	605	545	0,97

Nos conclusions sont donc les mêmes que dans le cas de la laccase : la sapamine n'inhibe pas et ne précipite pas ces oxydases. Cependant les mesures de stabilité ont fait apparaître des différences importantes selon l'activité diastasique et selon la quantité de sels présents.

Si nous opérons, non plus en présence de 0,3 cm³ de tampon salin, mais en l'absence totale de sels (0,3 cm³ d'eau bidistillée), la solution finale D₂ ainsi obtenue paraît beaucoup moins stable quant aux deux premières activités diastasiques. Les mesures effectuées avec l'appareil de Warburg ou colorimétriquement (sur le pyrocatéchol et sur la tyrosine) après des temps variant de 15 minutes à 26 heures donnent les résultats suivants :

Temps	Pyrocatéchol			Paracrésol			Hydroquinone		
	C	D ₁	D ₂	C	D ₁	D ₂	C	D ₁	D ₂
15 minutes	6 000	6 810		2 730	2 970	910	605	585	390
25 minutes			3 950						410
105 minutes						421			
5 heures	6 000	6 000	0 (col.)			0 (col.)			
17 heures									420
26 heures	4 300	4 300	0 (<100)	2 770	0 (<100)		460		

En présence de tampon les activités diastasiques diminuent lentement et la sapamine est sans influence. Au contraire en l'absence de tampon les activités catécholoxydasiques et paracrésolasiques sont détruites très rapidement (totalement en 4 à 5 heures, par 40 mg. de sapamine dans 1 cm³ d'extrait). Seule l'activité hydroquinonasiqne reste peu altérée dans ces conditions. Une influence des sels minéraux a déjà été notée dans l'action des savons cationiques sur les protéines (p. 9). L'absence de parallélisme entre les activités de l'extrait de

champignon semble s'accorder avec l'hypothèse d'un mélange de systèmes oxydasiques distincts (catécholoxydase + laccase).

Ici encore les saponiums trouvent une application pratique intéressante dans la dissociation d'activités enzymatiques complexes.

4. *Acide ascorbique-oxydase* (Mesures effectuées avec l'appareil de Warburg sur l'acide ascorbique en tampon pyridiné à pH 6,7 (ac. ascorbique 6 mg., eau bidistillée 1,9 cm³, pyridine 0,1 cm³). — Un jus d'écorce de concombre (*Cucumis sativus*), fractionné par le sulfate d'ammonium entre 0,33 et 0,60 saturé, et dialysé contre eau bidistillée, nous a donné une solution (A) (extrait sec 2,5 mg./cm³) d'activité $Q_{O_2} \pm 4\ 140$, $Co_2 = 10\ 300$ (par cm³ de A). L'addition de sapamine MS en petite quantité (0,5 mg./cm³ de A) provoque la précipitation de substances inactives. Ce précipité se redissout dans un excès de sapamine.

Lorsqu'on laisse en contact un certain temps la solution A et la sapamine MS en proportion correspondant à l'optimum de précipitation, l'activité du liquide surnageant diminue assez rapidement ($Co_2 = 6\ 000$ après 35 minutes, 760 après 5 h. 40). Ceci nous montre la fragilité de l'acide ascorbique-oxydase dans ces conditions, encore plus grande que celle de la catécholoxydase.

Un excès de sapamine ralentit cette perte d'activité : par exemple pour 1 mg. de sapamine dans 1 cm³ de A le liquide surnageant présente encore une activité de 10 100 après 5 heures. La sapamine peut donc stabiliser l'acide ascorbique-oxydase.

Cette stabilisation est beaucoup meilleure en présence de tampon, comme nous l'avons déjà vu pour la catécholoxydase : par exemple pour 40 mg. de sapamine dans 1 cm³ de A, le liquide surnageant a une activité de 4 300 après 5 heures de contact sans tampon, et de 10 400 après 5 heures de contact en présence de tampon phosphaté M/20 à pH 6,7. Dans ces conditions la solution A ne précipite pas.

Nous concluons donc comme dans le cas de la catécholoxydase : la sapamine n'inhibe pas l'activité acide-ascorbique-oxydasique ; mais l'activité oxydasique est rapidement détruite en l'absence de tampon. Elle permet en outre de séparer l'oxydase de protéines inactives.

5. *Cytochrome-oxydase*. — Deux préparations du cœur de porc, l'une selon Keilin et Hartree (190) (extrait sec 10 mg./cm³), l'autre selon Haas (134) (extrait sec 9 mg./cm³), d'activités respectives $Q_{O_2} = 236$ et 266 (mesurées à pH 7,8 dans les conditions de Keilin et Hartree) ont été additionnées de sapamine (35 mg. p. 100 mg.). Il y a ici un abondant précipité. Après centrifugation, ni le liquide surnageant ni le précipité remis en suspension n'ont d'activité sur le cytochrome c ou sur la p.phénylènediamine. Dans les conditions où nous avons opéré (pH 8) et maximum de précipitation, la sapamine inhibe totalement l'activité cytochrome-oxydasique.

L'importance biologique de cette diastase peut faire penser que son inhibition par les saponiums n'est pas étrangère à l'action antibiotique de ces derniers, au moins chez les organismes pour lesquels la chaîne des cytochromes est indispensable.

6. *Hydrolases*. — Nous avons insisté spécialement sur les enzymes d'oxydation, car ils nous paraissaient plus sensibles que d'autres à l'action de poisons et d'inhibiteurs. Mais les recherches récentes sur le mode d'action des antibiotiques naturels nous orientent aussi vers l'inhibition d'enzymes hydrolysants.

Nous avons essayé l'action du zéphirol sur une réaction d'hydrolyse des acides nucléiques par la *ribonucléodépolymérase* pancréatique (¹). Nous l'avons comparée à l'action de la streptomycine qui inhibe la ribonucléase (131, 279). Faisant agir 50 μ g. d'enzyme sur 1 mg. d'acide ribonucléique à pH 7,0 durant 30 minutes, nous précipitons l'acide nucléique non hydrolysé et nous dosons le phosphore de la fraction hydrolysée. Des doses de zéphirol allant de 20 à 500 μ g. nous donnent une inhibition croissante :

Zéphirol en μ g. . . .	0	20	50	100	200	500
Phosphore en μ g. . . .	48	49	46	37	28	25

10 000 u. o. de streptomycine donnent 23 μ g. de phosphore hydrolysé.

L'inhibition ne semble pas porter sur l'enzyme : en effet l'acide ribonucléique précipite lorsqu'on ajoute le zéphirol. La combinaison insoluble est évidemment moins attaquable par l'enzyme. C'est donc sur le substrat, et non sur l'enzyme, que porte l'action du saponium. Il est probable que la streptomycine agit de façon semblable (131).

Nous avons encore expérimenté en présence d'autres hydrolases : d'une diastase agissant sur les glucides (*amylase* salivaire) et d'une diastase agissant sur les protéines (*trypsine* pancréatique).

Nous nous sommes placés dans des conditions de concentration et de temps telles qu'il y ait un excès de substrat et que la quantité de substrat hydrolysé soit grossièrement proportionnelle à l'activité de l'enzyme. Le pH fut choisi voisin de l'optimum d'action de l'enzyme.

Nous avons fait agir la salive filtrée et convenablement diluée dans un tampon phosphaté à pH 6,7 et additionnée de petites quantités de chlorure de sodium (0,1 cm³ de salive + 1 cm³ de tampon phosphaté M/15 + 2 gouttes de solution de ClNa à 9 0/00) sur un empois d'amidon fraîchement préparé (2 cm³ à 1 0/0) durant 1 minute

(¹) Cette recherche a été faite avec M. François Gros que nous remercions très amicalement.

au bain-marie à 37°. Le dosage des sucres réducteurs était effectué selon une méthode dérivée de celle de Tompsett (405).

Nous avons utilisé comme enzyme protéolytique une trypsine commerciale, que nous avons mise en présence de sérumalbumine dans un tampon à pH 8,0. Le dosage des amines libérées fut effectué par la technique de Van Slyke.

Les résultats nous ont montré que le zéphirol à faible dose n'a aucune action inhibitrice sur ces enzymes. A dose élevée, l'inhibition peut devenir assez importante.

Par exemple pour 0,1 cm³ de salive, l'activité amylasique n'est pas modifiée au-dessous de 1 mg. de zéphirol. Pour 5 mg., l'activité est réduite à 1/4.

L'oléate de sodium a une action analogue.

D'autre part, le zéphirol précipite une fraction inactive de la salive (mucines) et permet ainsi un début de purification de l'amylase.

CONCLUSION. — Etant donné le nombre élevé des systèmes enzymatiques participant à la vie d'une cellule, il nous est difficile de tirer une conclusion à partir de ces quelques exemples. Ceux-ci nous montrent simplement l'intérêt qu'il y aurait à étendre ces recherches à tous ces biocatalyseurs (1). Certaines publications récentes traitent ainsi de l'action de détergents cationiques sur la protyrosinase (des œufs de sauterelle, *Melanoplus differentialis*) (3), sur la décarboxylation de l'acide glutamique et de la glutamine par des extraits de *Cl. Welchii*, *Proteus* et *E. Coli* (164, 207) et sur l'activité peptique du suc gastrique (193).

Le résultat le plus tangible de cette étude est peut-être de nous montrer l'intérêt biochimique de ces saponiums : ils constituent un nouveau réactif en enzymologie. Soit qu'ils permettent la purification d'un enzyme, soit qu'ils l'inhibent, soit qu'ils l'activent par élimination d'un inhibiteur naturel, soit qu'ils le stabilisent en solution aqueuse, les saponiums trouvent des applications multiples.

Parmi les systèmes étudiés plus haut, seule la cytochrome-oxydase fut totalement inhibée par le zéphirol. Peut-on attribuer à cette réaction l'effet bactéricide des saponiums ?

Autrement dit peut-on étendre les résultats obtenus *in vitro* au comportement des saponiums *in vivo* ?

Sevag et Ross (372) ont montré qu'à une concentration de 1/35 000 le zéphirol inhibe complètement l'oxydation de la *p*.phénylènediamine dans la cellule de levure (c'est-à-dire l'action cytochrome-oxydasique) (voir aussi Ordal et Borg (306), D. Jerchel (211)). A cette concentration, il inhibe aussi les oxydations aérobies (ou anaérobies)

(1) Kuhn et Bielig en 1940 avaient déjà montré que le zéphirol ne modifiait pas l'activité de la catalase du foie de cheval (du moins tant qu'on n'a pas précipité l'enzyme en milieu alcalin).

du glucose. Roberts et Rahn (356) trouvent aussi que le zéphirol inhibe les déshydrogénases et les oxydases de *E. coli* dans les conditions où la bactérie est tuée. Ils montrent qu'à une dose de saponium inférieure (dose bactériostatique et non bactéricide) les déshydrogénases et les oxydases ne sont pas touchées.

Il nous semble donc possible d'attribuer à l'inhibition de la cytochrome-oxydase un rôle dans l'action bactéricide et antibiotique des saponiums. D'autres systèmes analogues sont sans doute en cause pour les organismes anaérobies. Il est difficile de comparer les doses ou les concentrations bactéricides et les doses inhibant telle réaction enzymatique, car le saponium se fixe électivement sur certaines parties de la cellule et même sur certains systèmes enzymatiques. Nous avons montré (p. 25) que, dans le sérum sanguin par exemple, les saponiums commençaient par se fixer sur une fraction très riche en lipides. Il est probable que cette affinité des savons cationiques pour les cénapses riches en lipides se retrouve au niveau des cellules (¹). La membrane protidolipidique constitue le premier point vulnérable de la cellule : aussi avons-nous constaté que la dose lytique (perméabilisation aux phosphates minéraux) était inférieure à la dose inhibant l'oxydation du glucose. La dose bactériostatique serait peut-être en relation avec cette atteinte de la membrane cellulaire qui ne serait pas encore mortelle. Et la dose bactéricide correspondrait à l'action du saponium sur les systèmes oxydatifs de la cellule (cytochrome-oxydase). Nous pensons donc que les systèmes enzymatiques les premiers touchés dans la cellule sont constitués par des cénapses riches en lipides. La dénaturation de ces cénapses, peut-être plus que celle des protéines (103, 411), serait ainsi à l'origine de la mort des cellules.

CONCLUSIONS

Nous avons étudié l'action des amines quaternaires à chaîne grasse, détergents cationiques, pour lesquels nous avons proposé le nom de « saponiums », sur les protéines, les lipides et les cénapses lipido-protéiques isolés ou au sein des cellules.

Nous avons d'abord constaté que ces saponiums donnent avec les anions à poids moléculaires élevés (acides gras, acides nucléiques, protéines, phospholipides, cérébrosides, gommes, etc.) des précipités

(¹) Nous sommes ici d'accord avec Baker, Harrison et Miller (13), pour attribuer à l'action des saponiums sur les lipides un grand rôle dans leur action biologique. Les lipides [phospholipides (34, 117), Baker, Harrison et Miller (13), graisses neutres (342, 345), lait (78, 343), sérum (cénapses ?) (157, 195, 341)] protègent les cellules contre les saponiums.

sans qu'il s'agisse d'un relargage de ces corps, mais bien de la formation de composés stœchiométriques. Nous avons déterminé les conditions de précipitation de ces substances en fonction des concentrations relatives du saponium et des anions, du pH et de la concentration en sels minéraux du milieu. L'étude physique de ces composés (solubilité, stabilité, électrophorèse, tension superficielle, pouvoir rotatoire, pression osmotique, etc.) nous a permis de mettre en évidence à côté de la liaison saline d'autres formes de liaisons (du type des forces de Van der Waals entre chaînes hydrophobes), d'où un comportement analogue à celui des « cénapses » qu'on peut rapprocher des « coacervats ».

Nous avons reconnu le pouvoir solubilisant des saponiums vis-à-vis de nombreuses substances insolubles dans l'eau (lipides, protéides, etc.) et plus particulièrement vis-à-vis de la lécithine et de certains lipoprotéides insolubles. Avec le cholestérol, ils forment des complexes dont nous avons étudié les propriétés.

A l'aide de techniques physiques, et notamment de l'électrophorèse, nous avons trouvé que le fractionnement du sérum sanguin par les saponiums conduit à diviser les protéides en des catégories différentes de celles antérieurement décrites. Les protéides qui précipitent les premiers et présentent le plus d'affinités pour les saponiums sont les plus riches en lipides.

L'étude du comportement des lipoprotéides en présence de saponiums (décollement du cholestérol par l'éther, absence de décollement des phospholipides, précipitation d'une cénapse du sérum très riche en lipides) nous amène à envisager une théorie de l'action des saponiums sur les protéines et sur les cénapses.

Cette affinité des saponiums pour les cénapses se traduit sur le plan biologique par leur action antibiotique. Nous avons précisé leurs points d'attaque sur la cellule vivante :

1° la surface limitante cytoplasmique, sur laquelle les saponiums peuvent, suivant les cas, se fixer ou bien avoir une action lysante, et nous avons découvert à ce propos comment une telle action lysante pouvait être transformée en une action agglutinante par simple addition de cholestérol.

2° Les cénapses endocellulaires et particulièrement les systèmes enzymatiques : certains, comme la cytochrome-oxydase, sont détruits, d'autres, comme la xanthinedéhydrase, sont au contraire activés.

Nous avons discuté le mécanisme de l'action bactériolytique et de l'action bactéricide des saponiums.

La comparaison des différents saponiums nous a, dans une certaine mesure, permis de relier certaines actions biochimiques à la structure particulière de ces cations ; ainsi la présence d'une fonction amide d'acide gras (sapamine) est un facteur de solubilité pour les cénapses saponioprotéiques ; l'existence d'une chaîne aliphatique

simple (zéphirol) est au contraire propice à une meilleure précipitation des protéides ; quant à la structure en double chaîne ou en chaîne ramifiée (désogène), elle est favorable à la délipidation des cénapses et à une action dissolvante des phospholipides.

Les divergences que nous avons établies entre les saponiums et les savons anioniques s'expliquent par la dissymétrie d'ionisation des protéines et d'autres constituants de la matière vivante.

Nous avons montré combien les saponiums pouvaient être des réactifs biochimiques intéressants en envisageant leurs applications dans de nombreux domaines :

a) pour la solubilisation, le dosage, l'isolement, la caractérisation ou l'élimination de protéines ;

b) pour le fractionnement de mélanges protéidiques : sérum, organes, etc. ;

c) pour la délipidation ou pour la mise en solution aqueuse de cénapses lipoprotéiques ;

d) pour la préparation, la purification, l'inhibition ou la séparation de systèmes enzymatiques.

Enfin, cette étude nous a ouvert des horizons nouveaux sur un grand nombre de problèmes biochimiques par les incidences que pouvaient avoir sur eux les résultats de nos recherches, ou par les analogies qu'ils présentent avec les problèmes que nous essayons de résoudre : propriétés biochimiques d'amines quaternaires naturelles comme la lécithine, mécanisme de la cytolyse, structure des cénapses et des systèmes enzymatiques, mécanisme de la réaction antigène-anticorps, mode d'action de certains antibiotiques.

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Chimie Biologique de l'Institut Pasteur sous la direction de M. le Professeur M. Machebœuf, mon Maître, à qui je tiens à redire ma très grande reconnaissance pour les années passées dans son si sympathique laboratoire. Qu'il trouve ici l'expression de mes vifs remerciements et de mon très fidèle attachement.

BIBLIOGRAPHIE

1. ABDERHALDEN (E.) et LE COUNT (E. R.). — *Z. exp. Path. u. Therap.*, 1905, **2**, 199.
2. ADNOT (A.). — Contribution à l'étude des protides du sérum. *Thèse Méd. Strasbourg*, 1931.
3. ALLEN (T. H.) et BODINE (J. H.). — *Proc. Nat. Acad. Sc. U. S.*, 1941, **27**, 269-276.
4. ALLEN (T. H.) et BODINE (J. H.). — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1942, **49**, 666-669.
5. ANSON (M. L.). — *J. Gen. Physiol.*, 1939, **23**, 239-246.
6. ANSON (M. L.). — *J. Gen. Physiol.*, 1941, **24**, 399-421.
7. VAN ANTWERPEN (F. J.). — *Ind. Eng. Chem., Ind. Ed.*, 1943, **35**, 126.
8. ARCHIBALD (R. M.). — *J. Biol. Chem.*, 1946, **165**, 443-448.
9. ASTBURY (W. T.). — *Adv. Enzymol.*, 1943, **3**, 63.
10. ASTBURY (W. T.), DICKINSON (S.) et BAILEY (K.). — *Biochem. J.*, 1935, **29**, 2351.
11. BAKER (Z.), HARRISON (P. W.) et MILLER (B. F.). — *J. Exp. Med.*, 1941, **73**, 249-271.
12. BAKER (Z.), HARRISON (R. W.) et MILLER (B. F.). — *J. Exp. Med.*, 1941, **74**, 611-620.
13. BAKER (Z.), HARRISON (R. W.) et MILLER (B. F.). — *J. Exp. Med.*, 1941, **74**, 621-637.
14. BALLOU (G. A.), BOYER (P. D.) et LUCK (J. M.). — *J. Clin. Invest.*, 1944, **23**, 454.
15. BALLOU (G. A.), BOYER (P. D.) et LUCK (J. M.). — *J. Biol. Chem.*, 1945, **159**, 111.
16. BALLOU (G. A.), BOYER (P. D.), LUCK (J. M.) et LUM (F. G.). — *J. Biol. Chem.*, 1944, **153**, 589.
17. BAWDEN (F. C.) et PIRIE (N. W.). — *Brit. J. Exptl. Path.*, 1938, **19**, 66-82.
18. BAWDEN (F. C.) et PIRIE (N. W.). — *Brit. J. Exptl. Path.*, 1938, **19**, 261-263.
19. BAYLISS (M.). — *J. Infect. Diseases*, 1936, **59**, 131-136.
20. BAYLISS (M.). — *J. Lab. Clin. Med.*, 1943, **28**, 748-751.
21. BAYLISS (M.) et HALVORSON (H. O.). — *J. Bact.*, 1935, **29**, 9-10.
22. BELOZERSKY (A. N.) et BAZHILINA (G. D.). — *Biokhimiia*, 1944, **9**, 134.
23. BERTRAND (D.) et POLONOVSKI (J.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **142**, 926.
24. BIRKELAND (J. M.) et STEINHAUS (E. A.). — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1939, **40**, 86-88.
25. BLANQUET (P.) et TAYEAU (F.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1947, **29**, 683.

26. BLASS (J.), SPRINGELL (P.) et MACHEBŒUF (M.). — *Ann. Inst. Past.*, 1948, **75**, 442.
27. BLUM (J.) et VALERIO (M.). — *Schweitz. Med. Woch.*, 1946, **76**, 737.
28. BODINE (J. H.) et CARLSON (L. D.). — *J. Gen. Physiol.*, 1941, **24**, 423-432.
29. BODINE (J. H.) et HILL (D. L.). — *Arch. Biochem.*, 1945, **7**, 21-32.
30. BOYER (P. D.), BALLOU (G. A.) et LUCK (J. M.). — *J. Biol. Chem.*, 1946, **162**, 199.
31. BOYER (P. D.), BALLOU (G. A.) et LUCK (J. M.). — *J. Biol. Chem.*, 1947, **167**, 407-424.
32. BOYER (P. D.), LUM (F. G.), BALLOU (G. A.), LUCK (J. M.) et RICE (R. G.). — *J. Biol. Chem.*, 1946, **162**, 181.
33. BRESSLER (S. E.) et TALMUD (D. L.). — *C. R. Acad. Sci. U. R. S. S.*, 1944, **43**, 310, 314, 326 et 367.
34. BREWER (C. M.). — *Soap Sanit. Chem.*, 1943, **19**, 101-107.
35. BÜCHMANN (H.). — *Fette u. Seifen*, 1941, **48**, 759.
36. BULL (H. B.). — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1945, **67**, 10-12.
37. BULL (H. B.). — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1946, **68**, 747.
38. BULL (H. B.) et NEURATH (H.). — *J. Biol. Chem.*, 1937, **118**, 163.
39. BURNET (F. M.) et LUCK (D.). — *Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci.*, 1940, **18**, 141-150.
40. BUSCH (L.), NEUMANN (H. J.) et STUDNITZ (G. V.). — *Naturwiss.*, 1941, **29**, 781.
41. CHARGAFF (E.). — *J. Biol. Chem.*, 1938, **125**, 661.
42. CHARGAFF (E.) et BENDICH. — *Science*, 1944, **99**, 147.
43. CHARGAFF (E.) et ZIFF. — *J. Biol. Chem.*, 1939, **131**, 25.
44. CHARONNAT (R.). — *J. Pharm. et Chim.*, 1935, **22**, 574.
45. CHARONNAT (R.). — *J. Pharm. et Chim.*, 1936, **23**, 307.
46. CHINARD (F. P.). — *J. Biol. Chem.*, 1948, **176**, 1439-1447.
47. CLARK (H. M.) et EVANS (F. A.). — *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 1921, **32**, 113.
48. COHN (E. J.). — *Experimentia*, 1947, **3**, 125.
49. CORRIN (M. L.) et HARKINS (W. D.). — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1947, **69**, 683.
50. COWLES (P. B.). — *Yale J. Biol. Med.*, 1938, **11**, 33-38.
51. CRAIG (L. E.). — *Chem. Rev.*, 1948, **42**, 285-410.
52. DANIELLI (J. F.). — *J. Cell. Comp. Physiol.*, 1936, **7**, 393.
53. DANIELLI (J. F.) et HARVEY (E. N.). — *J. Cell. Comp. Physiol.*, 1935, **5**, 483.
54. DANIELS (R. C.). — *Ann. Rev. Biochem.*, 1943, **12**, 447.
55. DAVIS (B. D.). — *Ann. Scientist*, 1946, **24**, 611.
56. DAVIS (B. D.) et DUBOS (R. J.). — *Arch. Biochem.*, 1946, **11**, 201-203.
57. DAVSON (H.) et DANIELLI (J. F.). — *The permeability of natural membrane*. Macmillan. Cambridge 1943.
58. DEGERING (E.). — *J. Chem. Education*, 1941, **18**, 102.
59. DEKWITZ. — *Ergebn. d. Physiol.*, 1931, **32**, 821.
60. DELAGE (B.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1936, **18**, 1304.
61. DELAGE (B.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1936, **18**, 1603.

62. DELAGE (B.). — Le système lipoprotéidique du sérum sanguin. *Thèse de Doctorat ès Sciences*, Paris, 1939.
63. DELEZENNE (C.) et FOURNEAU (E.). — *Bull. Soc. Chim.*, 1914, **15**, 421-434.
64. DELSAL (J. L.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1944, **26**, 99-105.
65. DELSAL (J. L.). — 8^e Congrès de Chimie Biologique. Paris 1948. *Bull. Soc. Chim. Biol.* (sous presse).
66. DERVICHIAN (D. G.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1940, **211**, 792.
67. DERVICHIAN (D. G.). — *J. Chim. Phys.*, 1941, **38**, 59.
68. DERVICHIAN (D. G.) et MACHEBEUF (M. H.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1938, **206**, 1511.
69. DERVICHIAN (D. G.) et MAGNANT (C.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1946, **28**, 419.
70. DERVICHIAN (D. G.) et MAGNANT (C.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1947, **29**, 655-659.
71. DERVICHIAN (D. G.) et MAGNANT (C.). — *Ann. Inst. Past.*, 1947, **73**, 841.
72. DESREUX (V.) et FABRY (C.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1946, **28**, 478.
73. DITTMAR (C.). — *Z. Krebsforsch.*, 1939, **49**, 519.
74. DOGNON (A.) et GOUGEROT (L.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1941, **23**, 230.
75. DOMAGK (G.). — *Deut. Med. Wochschr.*, 1935, **61**, 829-832.
76. DOWNIE (A. W.), STENT (L.) et WHITE (S. M.). — *Brit. J. exper. Path.*, 1931, **12**, 1.
77. DREGER (E. E.), KEIM (G. I.), MILES (G. D.), SHEDLOVSKY (L.) et ROSS (J.). — *Ind. Eng. Chem.*, 1944, **36**, 610-617.
78. DUBOIS (A. S.) et DIBBLEE (D. D.). — *J. Milk Tech.*, 1946, **9**, 1-9.
79. DUBOIS (A. S.) et DIBBLEE (D. D.). — *Science*, 1946, **103**, 734.
80. DUBOIS (A. S.) et DIBBLEE (D. D.). — *J. Bact.*, 1947, **53**, 251-252.
81. DUBOS (R. J.). — *J. Exp. Med.*, 1937, **66**, 101.
82. DUBOS (R. J.). — *J. Exp. Med.*, 1937, **66**, 873.
83. DUBOS (R. J.) et HOTCHKISS (R. D.). — *J. Exp. Med.*, 1941, **73**, 629.
84. DUBOS (R. J.). — *Ann. Rev. Biochem.*, 1942, **11**, 659-678.
85. DUBOS (R. J.). — *The bacterial cell*. Harvard Univ. Press Cambridge, Mass., 1945, 275-303.
86. DUEMLING (W. W.). — *Arch. Dermat. et Syph.*, 1941, **43**, 264.
87. DUGGAN (E. L.) et LUCK (J. M.). — *J. Biol. Chem.*, 1948, **172**, 205.
88. DUNN (C. G.). — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1936-1937, **35**, 427.
89. DUNN (C. G.). — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1938, **37**, 661-663.
90. DUNN (C. G.). — *Am. J. Hyg.*, 1937, **26**, 46-52.
91. DUNN (C. G.). — *Am. J. Surgery*, 1938, **41**, 268-271.
92. DYAR (M. T.). — *J. Bact.*, 1947, **53**, 498.
93. EGE (R.). — *Biochem. Z.*, 1922, **130**, 160.
94. ELDERED (F. R.) et NIEDERL (J. B.). — 102nd Meeting, Am. Chem. Soc. Atlantic City, 1941, 8-12 septembre.
95. ELKES (J. J.) et FINEAN (B.). — *Trans. Faraday Soc.* Congrès de Bordeaux 1947. Observations sur l'association détersif-hémoglobine et la structure des lipoprotéines périphériques du nerf.
96. ELKES (J. J.), FRAZER (A. C.) et SCHULMAN (J. H.). — *J. Physiol.*, 1945, **104**, 18 P.

97. EPSTEIN (A. K.), HARRIS (B. R.) et KATZMAN (M.). — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1943, **53**, 238-241.
98. EPSTEIN (A. K.), HARRIS (B. R.), KATZMAN (M. K.) et EPSTEIN (S.). — *Oil and Soap*, 1943 [9], **20**, 171-174.
99. ERICKSON (B. N.), AVRIN (I.), TEAGUE (D. M.) et WILLIAMS (H. H.). — *J. Biol. Chem.*, 1940, **135**, 671.
100. FAIR (G. M.), CHANG (S. L.), TAYLOR (M. P.) et WINEMAN (M. A.). — *Am. J. Pub. Health*, 1945, **35**, 228-232.
101. FALK (I. S.) et YANG (S. Y.). — *J. Infect. Dist.*, 1926, **38**, 8.
102. FEINSCHMIDT (J.). — *Biochem. Z.*, 1908, **13**, 153.
103. FISCHER (R.), SEIDENBERG (S.) et WEIS (U. P.). — *Helv. Chim. Acta*, 1949, **32**, 8.
104. FLOTOW (E.). — *Pharm. Zentralhalle*, 1942, **83**, 181-185.
105. FORMAN (L.). — *Lancet*, 1943 [245], **11**, 174.
106. FOURNEAU (J. P.) et CHANTALOU (S.). — *Bull. Soc. Chim.*, 1945, **12**, 845.
107. FOURNEAU (E.) et PAGE (H. J.). — *Bull. Soc. Chim.*, 1914 [4], **15**, 544.
108. FRANKENTHAL (K.). — *Z. Immunitätsforsch.*, 1925, **42**, 501.
109. FREDERICQ (E.). — *Bull. Soc. Chim. Belg.*, 1947, **56**, 223-237.
110. FREEMAN (S.), BURRIL (M. W.), LI (T.) et IVY (A. C.). — *Gastroenterology*, 1945, **4**, 332-343.
111. FREUDENBERG et STUMPF (W.). — Dissertat. W. Stumpf. Heidelberg 1941 in D. JERCHEL: Invertseifen und Tetrazeliumsalsze-Fiat. *Rev. Germ. Sci. Biochem.*, 1947, **1**, 59.
112. FULLER (A. T.). — *Biochem. J.*, 1942, **36**, 598-602.
113. FURCHGOTT (R. F.). — *Cold Spring Harbor Symp.*, 1940, **8**, 224.
114. GALE (E. F.) et TAYLOR (E. S.). — *Nature*, 1946, **157**, 549-550.
115. GALEOTTI (G.) et GIUMPALMO (G.). — *Arch. Fisiol.*, 1908, **5**, 503.
116. GARDNER (J. A.) et GAINSBOROUGH (H.). — *Biochem. J.*, 1927, **21**, 130.
117. GERSHENFELD (L.) et IBSEN (M.). — *Am. J. Pharm.*, 1942, **114**, 281-301.
118. GERSHENFELD (L.) et PERLSTEIN (D.). — *Am. J. Pharm.*, 1941, **113**, 89-92.
119. GERSCHENFELD (L.) et PERLSTEIN (D.). — *Am. J. Pharm.*, 1941, **113**, 237-255.
120. GLASSMAN (H. N.). — *Bact. Rev.*, 1948, **12**, 105-48.
121. GLEDHILL (W. S.). — *Australian J. Sci.*, 1944, **6**, 137-170.
122. GOLDSMITH (H. A.). — *Chem. Rev.*, 1943, **33**, 257-349.
123. GORTER (E.) et GRENDL (F.). — *J. Exptl. Med.*, 1925, **41**, 439.
124. GORTER (E.) et HERMANS (J. J.). — *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas*, 1943, **62**, 681.
125. GOTTSACKER (E.). — *Arch. Hyg. Bakt.*, 1942, **128**, 11-30.
126. GOTTSACKER (E.). — *Medizin. u. Chemie*, 1942, **4**, 553-572.
127. GOUGEROT (L.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1946.
128. GOULD (B. S.). — *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 1937, **36**, 290.
129. GRIENS (G.). — *Pfluger's Arch. f. d. ges. Physiol.*, 1896, **63**, 86.
130. GROS (F.) et MACHEBŒUF (M.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **142**, 738.
131. GROS (F.), RYBAK (B.), MACHEBŒUF (M.) et RAMBECH (U.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1948, **226**, 1550-1552.
132. GUTTMAN (J.). — *J. Clin. Investigation*, 1945, **24**, 296-300.

133. HAARMANN (W.) et FRÜHAUF-HEILMANN (E.). — *Biochem. Z.*, 1941, **309**, 13 et 1943, **314**, 1.
134. HAAS (E.). — *J. Biol. Chem.*, 1943, **148**, 481.
135. HAILER (E.). — *Z. Hyg. Infekt. Krankh.*, 1938, **121**, 67.
136. HANDOVSKY (H.) et WAGNER (R.). — *Biochem. Z.*, 1911, **31**, 32.
137. HARDY (W. B.) et GARDINER (S.). — *J. Physiol.*, 1910, **40**, LXVIII.
138. HARRIS (A. H.) and McCLURE (G. Y.). — *J. Lab. Clin. Med.*, 1942, **27**, 1591-1592.
139. HARSHBARGER (K. E.). — *J. Dairy Sci.*, 1942, **25**, 168-174.
140. HARTLEY (G. S.). — Hermann et Cie, Paris 1936. *Aqueous solutions of paraffin-chain salts*.
141. HARTLEY (G. S.). — *J. Chem. Soc.*, 1938, 1968.
142. HARTLEY (P.). — *Brit. J. Exp. Path.*, 1925, **6**, 180.
143. HARTMANN (M.) et KÆGI (H.). — *Z. angew. Chem.*, 1928, **41**, 127-130.
144. HARVEY (E. N.) et DANIELLI (J. F.). — *Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc.*, 1938, **13**, 319.
145. HAUSER (E. A.) et NILES (G. E.). — *J. Phys. Chem.*, 1941, **45**, 954-959.
146. HAUSER (E. D. W.) et CUTTER (W. W.). — *Am. J. Surg.*, 1944, **64**, 352-358.
147. HAWKINS (R. D.) et GUNTER (J. M.). — *Biochem. J.*, 1946, **40**, 192-197.
148. HEIDELBERGER (M.), KENDALL (F. E.), TEORELL (T.). — *J. Exp. Med.*, 1936, **63**, 819-826.
149. HENRY et STACEY. — *Proc. Roy. Soc. B*, 1946, **133**, 391.
150. HERRELL (W. E.) et HEILMAN (D. H.). — *Am. J. Med. Sci.*, 1943, **206**, 221-226.
151. HEWITT (L. F.). — *Biochem. J.*, 1936, **30**, 2229.¹
152. HILL (J. A.) et HUNTER (C. L. F.). — *Nature*, 1946, **158**, 585.
153. HIRSCH (M. M.) et NOVAK (M. V.). — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1942, **50**, 376-379.
154. HÖBER (R.) et HÖBER (J.). — *J. Gen. Physiol.*, 1942, **25**, 705-715.
155. HOFER (E.). — *Acta Biol. Exptl. (Warsaw)*, 1938, **12**, 70.
156. HOLMES (L. F.). — *J. Bact.*, 1940, **40**, 466.
157. HOogerHEIDE (J. C.). — *J. Bact.*, 1945, **49**, 277-289.
158. HORSFALL (F. L.) et GOODNER (K.). — *J. Exp. Med.*, 1935, **62**, 485.
159. HOTCHKISS (R. D.). — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1946, **46**, 479-494.
160. HOTCHKISS (R. D.). — *Chemotherapy : Applied cytochemistry in Currents in Biochemical Research*. D. E. Green N. Y., 1946, 379-398.
161. HOTCHKISS (R. D.) et DUBOS (R. J.). — *J. Biol. Chem.*, 1941, **141**, 155.
162. HOTCHKISS (R. D.). — *Adv. in Enzym.*, 1946, **4**, 153-199.
163. HUEPER (W. C.). — *Arch. Pathol.*, 1944, **38**, 381-391.
164. HUGHES (D. E.). — *Proc. Biochem. Soc., Biochem. J.*, 1948, **43**, XVI.
165. HUGHES (D. L.) et EDWARDS (S. J.). — *J. Hyg.*, 1946, **44**, 442-450.
166. HUNTER (A.) et DOWNS (C. E.). — *J. Biol. Chem.*, 1948, **173**, 31-39.
167. HUYCK (C. L.). — *Am. J. Pharm.*, 1944, **116**, 1-10.
168. HUYCK (C. L.). — *Am. J. Pharm.*, 1944, **116**, 50-59.
169. HUYCK (C. L.). — *J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed.*, 1945, **34**, 5-11.
170. HUYCK (C. L.) et DAVY (E. D.). — *J. Amer. Pharm. Assoc. Pract. Pharm. Ed.*, 1947, **8**, 27.

171. JACOBS (M. H.). — *Am. J. Physiol.*, 1924, **68**, 144.
172. JACOBS (M. H.). — *The Harvey Lectures*, 1927, **22**, 146.
173. JACOBS (M. H.) et STEWART (D. R.). — *J. Cell. Comp. Physiol.*, 1936, **7**, 351.
174. JACOBS (W. A.). — *J. Exptl. Med.*, 1916, **23**, 563-568.
175. JACOBS (W. A.), HEIDELBERGER (M.) et AMOSS (H. L.). — *J. Exptl. Med.*, 1916, **23**, 569-576.
176. JACOBS (W. A.), HEIDELBERGER (M.) et BULL (C. G.). — *J. Exptl. Med.*, 1916, **23**, 577-599.
177. JAFFÉ (W. G.). — *J. Biol. Chem.*, 1943, **148**, 185-186.
178. JARISCH (A.). — *Pflüg. Arch. f. d. ges. Physiol.*, 1922, **194**, 337.
179. JERCHER (D.). — *Ber. chem. Ges.*, 1942, **758**, 75-81.
180. JERCHER (D.). — *Ber. chem. Ges.*, 1943, **76**, 600-609.
181. JERCHER (D.). — *Fiat Rev. Germ. Sci.*, 1939-1946; *Biochem.*, 1947, **1**, 59-65.
182. JERCHER (D.) et MÖHLE (W.). — *Ber. chem. Ges.*, 1944, **77**, 591.
183. JIRGENSENS (Br.). — *Kolloid Beih.*, 1936, **44**, 285.
184. JOANNIDES (G.). — *Arch. Inst. Past. Hellénique*, 1924, n° 2, 224.
185. JOHNSON (F. H.). — *J. Bact.*, 1944, **47**, 551.
186. JONES (C. B.) et MECHAM (D. K.). — *Arch. Biochem.*, 1943, **3**, 193-202.
187. KABAT (E. A.), HANGER (F. M.), MOORE (D. H.) et LANDOW (H.). — *J. Clin. Invest.*, 1943, **22**, 563.
188. KAUFTHIL et NEUBAUER. — *Klin. Wochschr.*, 1924, **3**, 1623.
189. KEESER. — *Zeitschr. f. Klin. Med.*, 1924, **99**, 186.
190. KEILIN (D.) et HARTREE (E. F.). — *Proc. Roy. Soc. B.*, 1938, **125**, 171.
191. KENDE (S.). — *Biochem. Z.*, 1917, **82**, 9.
192. KENNER (B. A.), QUISNO (R. A.), FOTER (M. J.) et GIBBY (I. W.). — *J. Bact.*, 1946, **52**, 449-451.
193. KIRSNER (J. B.) et WOLFF (R. A.). — *Gastroenterology*, 1944, **2**, 270-3.
194. KLARMANN (E. G.). — *Soap Sanit. Chemicals*, 1946, **22** [2], 125-127. 129, 131; **22** [3], 133, 135, 137, 139, 141, 147.
195. KLARMANN (E. G.) et WRIGHT (E. S.). — *Soap Sanit. Chemicals*, 1944 [2], **20**, 103-105, 135.
196. KLARMANN (E. G.) et WRIGHT (E. S.). — *Soap Sanit. Chemicals*, 1946 [1], **22**, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137.
197. KLEIN (M.), KALTER S. S.) et MUDD (S.). — *J. Immunol.*, 1945, **51**, 389-396.
198. KLEIN (M.) et KARDON (Z. G.). — *J. Bact.*, 1947, **54**, 245-251.
199. KLEIN (M.) et STEVENS (D. A.). — *J. Immunol.*, 1945, **50**, 265-274.
200. KLIEWE (A.). — *Zentr. Bakt. Parasitenk.*, 1942, **148**, 291-300.
201. KNIGHT (C. A.) et STANLEY (W. M.). — *J. Exptl. Med.*, 1944, **79**, 291-300.
202. KOLLOFF (H. G.), WYSS (A. P.), HIMELICK (R. E.) et MANTELE (F.). — *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.*, 1942, **31**, 51-53.
203. KOLTHOFF (I. M.) et JOHNSON (W. F.). — *J. Phys. Colloid. Chem.*, 1948, **52**, 22.
204. KOLTHOFF (I. M.) et STRICKS (W.). — *J. Phys. Colloid. Chem.*, **52**, 915-941.
205. KOZLOWSKY (A.). — *J. Exp. Med.*, 1925, **42**, 453.
206. KRAMER (S. D.) et GROSSMAN (L. H.). — *J. Immunol.*, 1936, **31**, 183-189.
207. KREBS (H. A.). — *Biochem. J.*, 1948, **42**, V.

208. KROG (A. G.) et MARSHALL (C. G.). — *Am. J. Pub. Health*, 1940, **30**, 341-348.
209. KROG (A. G.) et MARSHALL (C. G.). — *J. Milk Tech.*, 1942, **5**, 343-347.
210. KÜHN (M.). — *J. Prakt. Chem.*, 1940, **156**, 103.
211. KUHN (R.) et BIELIG (H. J.). — *Ber. Chem. Ges.*, 1940, **73**, 1080, 91.
212. KUHN (R.) et DANN (O.). — *Ber. Chem. Ges.*, 1940, **73**, 1092-1094.
213. KUHN (R.) et JERCHEL (D.). — *Ber. Chem. Ges.*, 1940, **73**, 1100-1105.
214. KUHN (R.) et JERCHEL (D.). — *Ber. Chem. Ges.*, 1941, **74**, 941-948.
215. KUHN (R.) et JERCHEL (D.). — *Ber. Chem. Ges.*, 1941, **74**, 949-952.
216. KUHN (R.), JERCHEL (D.) et WESTPHAL (O.). — *Ber. Chem. Ges.*, 1940, **73**, 1095-1100.
217. KUHN (R.) et WALLENFELS (K.). — *Ber. Chem. Ges.*, 1940, **73**, 458.
218. KUHN (R.) et WESTPHAL (O.). — *Ber. Chem. Ges.*, 1940, **73**, 1105-1108.
219. KUHN (R.) et WESTPHAL (O.). — *Ber. Chem. Ges.*, 1940, **73**, 1109-1113.
220. LAMAR (R. V.). — *J. Exp. Med.*, 1911, **13**, 380.
221. LAMAR (R. V.). — *J. Exp. Med.*, 1911, **14**, 256.
222. LARSON (W. P.), EVANS (R. D.) et NELSON (E.). — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1925, **22**, 194-196.
223. LARSON (W. P.) et HALVORSON (H. O.). — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1925, **22**, 550-552.
224. LARSON (W. P.) et NELSON (E.). — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1942, **21**, 278.
225. LECOMTE DU NOÛY (P.). — *J. Exp. Med.*, 1922, **36**, 115-134.
226. LECOMTE DU NOÛY (P.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1923, **89**, 1148.
227. LECOMTE DU NOÛY (P.). — *Surface equilibria of biological and organic colloids*. New-York, 1926.
228. LECOMTE DU NOÛY (P.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1928, **99**, 1097.
229. LEVENE (P. A.) et ROLF (I. P.). — *J. Biol. Chem.*, 1927, **72**, 587.
230. LEVIN (B. S.) et MAGAT (I.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1934, **115**, 1619-1620.
231. LI (C. H.). — *J. Biol. Chem.*, 1944, **155**, 45.
232. LIBER (A.). — Contribution à l'étude des antiseptiques savons-sels biliaires. Thèse Pharmacie, Paris, 1941.
233. LIEBERMANN (L.). — *Arch. f. ges. Physiol.*, 1893, **54**, 573.
234. LONG et GEPHART. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1908, **30**, 881, 1312.
235. LONGSWORTH (L. G.) et Mc INNES (D. A.). — *J. Gen. Physiol.*, 1942, **25**, 507.
236. LUNDGREN (H. P.). — *Textile Research J.*, 1945, **15**, 335-353.
237. LUNDGREN (H. P.). — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1941, **63**, 2854.
238. LUNDGREN (H. P.), ELAM (D. W.) et O'CONNELL (R. A.). — *J. Biol. Chem.*, 1943, **149**, 183-193.
239. LUNDGREN (H. P.) et O'CONNELL (R. A.). — *Ind. Eng. Chem.*, 1944, **36**, 370.
240. MC BAIN (J. W.). — *Act. Colloid Sci.*, 1942, **1**, 99.
241. MC BAIN (J. W.). — Solubilization and other factors in detergent action, in *Colloid Chemistry*, J. Alexander, Reinhold Publishing Corporation N. Y., 1944, **5**, 102-120.
242. MC BAIN (J. W.) et BRADY (A. P.). — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1943, **65**, 2072.

243. MC BAIN (J. W.), LEE, MERRILL et O'CONNOR. — *Chem. Prod.* (London), 1941, **4**, 19.
244. MC BAIN (J. W.) et MERRILL (R. C.). — *Ind. Eng. Chem.*, 1942, **34**, 915.
245. MC BAIN (J. W.), MERRILL (R. C.) et VINOGRAD. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1941, **63**, 670.
246. MC CALLA (T. M.). — *J. Bact.*, 1940, **40**, 23-32.
247. MC CUTCHEON (J. W.). — *Chem. Ind.*, 1947, **61**, 811-824.
248. MC FARLANE (A. S.). — *Nature*, 1942, **149**, 439.
249. MC FARLANE (M. G.) et KNIGHT (B. C. J. G.). — *Biochem. J.*, 1941, **35**, 884-902.
250. MACHEBŒUF (M.). — Thèse de Doctorat ès Sciences, Paris, 1928. *Recherches sur les stérols, les lipides et les protéides du sérum et du plasma sanguins.*
251. MACHEBŒUF (M.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1929, **11**, 268.
252. MACHEBŒUF (M.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1929, **11**, 485.
253. MACHEBŒUF (M.). — XIII^e Congrès International de Physiologie de Boston, août 1929. — Sur l'état physicochimique de la lécithine et des esters de cholestérol dans le sérum sanguin.
254. MACHEBŒUF (M.). — *Etat des lipides dans la matière vivante. Les cénapses et leur importance biologique*, 1 vol., Hermann édit., Paris, 1937.
255. MACHEBŒUF (M.). — *Exp. ann. Biochim. Med.*, 1945, **5**, 71-104.
256. MACHEBŒUF (M.) et DELSAL (J. L.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1942, **24**, 296.
257. MACHEBŒUF (M.) et DELSAL (J. L.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1943, **26**, 116.
258. MACHEBŒUF (M.), DELSAL (J. L.), LÉPINE (P.) et GIUNTINI (J.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1943, **69**, 321.
259. MACHEBŒUF (M.) et SANDOR (G.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1931, **13**, 745. — Voir aussi MACHEBŒUF (M.). *C. R. Acad. Sci.*, 1931, **192**, 1413.
260. MACHEBŒUF (M.) et MONNIER. — *C. R. Soc. Biol.*, 1941, **135**, 1241.
261. MACHEBŒUF (M.) et SANDOR (G.). — *C. R. Acad. Sc.*, 1932, **194**, 1102.
262. MACHEBŒUF (M.) et SANDOR (G.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1932, **14**, 1168; *Arch. Intern. Physiol. et Physicoch. biol.*, 1932 et Congrès int. Physiol, Rome, 1932, 63.
263. MACHEBŒUF (M.) et TAYEAU (F.). — *C. R. Acad. Sc.*, 1938, **206**, 860.
264. MACHEBŒUF (M.) et TAYEAU (F.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **129**, 1181.
265. MACHEBŒUF (M.) et TAYEAU (F.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **129**, 1184.
266. MACHEBŒUF (M.) et TAYEAU (F.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1941, **23**, 31.
267. MACHEBŒUF (M.) et TAYEAU (F.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1941, **23**, 49.
268. MACHEBŒUF (M.) et VISCONTINI (M.). — *C. R. Acad. Sc.*, 1943, **217**, 305.
269. MACHEBŒUF (M.) et VISCONTINI (M.). — *Ann. Inst. Past.*, 1945, **71**, 188.
270. MACHEBŒUF (M.) et VISCONTINI (M.). — *Ann. Inst. Past.*, 1946, **72**, 631.
271. McMEEKIN (T. L.). — *Federation Proc.*, 1942, **1**, 125.

272. McMEEKIN (T. L.), POLIS, DELLA MONICA et CUSTER. — *Federation Proc.*, 1948, **7**, 172.
273. MADSEN (Th.) et NOGUCHI (H.). — *Zentralbl. Bakt.*, 1905, **37**, 367.
274. MANTE (J.) et LUPEA (V.). — *Bull. Ac. Med. Roumanie*, 1939, **8**, 442.
275. MARFORI (L.). — *Arch. Sc. Med*, 1937, **63**, 161.
276. MARRACK (J.) et HÖLLERING. — *Brit. J. Exp. Path.*, 1938, **19**, 424.
277. MARRACK (J.) et SMITH (F. C.). — *Proc. Roy. Soc*, 1930, **106**, 1-19.
278. MARRON (T. U.) et MORELAND (F. B.). — *Enzymologia*, 1939, **6**, 225-228.
279. MASSART, PEETERS et VANHOUE. — *Experientia*, 1947, **3**, 494.
280. MATSUMURA (S.). — *Kolloid Z.*, 1923, **32**, 173.
281. MAYER (A.) et TERROINE (E.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1907, **62**, 317.
282. MELLANDER (O.). — *Biochem. Z.*, 1935, **277**, 305.
283. MERRILL (R. C.) et GETTY (R.). — *J. Phys. colloid chem.*, 1948, **52**, 774.
284. MICHAELIS (L.) et DAVIDSOHN (H.). — *Biochem. Z.*, 1912, **47**, 59.
285. MILLER (B. F.), ABRAMS (R.), HUBER (D. A.) et KLEIN (M.). — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1943, **54**, 174-176.
286. MILLER (B. F.), BAKER (Z.), HARRISON (R. W.). — *Proc. Exp. Biol. Med.*, 1939, **42**, 705-706.
287. MILLER (B. F.), MUNTZ (J.) et BRADEL (S.). — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1940, **45**, 104-108.
288. MILLER (G. L.) et ANDERSON (K. J. I.). — *J. Biol. Chem.*, 1942, **144**, 475-486.
289. MILLER (Z. B.), LEMON (H. M.) et MILLER (B. F.). — *Federation Proc.*, 1942, **1**, 126.
290. MIRSKY (A. E.) et POLLISTER (A. W.). — *J. Gen. Physiol.*, 1946, **30**, 117-148.
291. MIRSKY (A. E.) et POLLISTER (A. W.). — *Proc. Nat. Acad. Sc.*, 1942, **28**, 344.
292. MŒWUS (F.). — *Biol. Zbl.*, 1940, **60**, 143.
293. MŒWUS (F.). — *Der Erbartz*, 1941, **9**, 145.
294. MOORE (D. B.), PIERSON (P. S.), HANGER (F. M.) et MOORE (D. H.). — *J. Clin. Invest.*, 1945, **24**, 292.
295. NEDZVETSKY (S. V.). — *Biokhimiia*, 1947, **12**, 314.
296. NETER (E.). — *Science*, 1942, **96**, 209-210.
297. NETER (E.). — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1942, **51**, 254-256.
298. NETER (E.). — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1942, **51**, 256-258.
299. NEUFELD (F.). — *Zeitschr. Hyg.*, 1900, **34**, 454.
300. NEURATH (H.), COOPER (G. R.) et ERICKSON (J. O.). — *J. Biol. Chem.*, 1941, **138**, 411-436.
301. NEURATH (H.) et GREENSTEIN (J. P.). — *Ann. Rev. Biochem.*, 1944, **13**, 117.
302. NEURATH (H.), GREENSTEIN (J. P.), PUTNAM (F. W.) et ERICKSON (J. O.). — *Chem. Rev.*, 1944, **34**, 157.
303. NEURATH (H.) et PUTNAM (F. W.). — *J. Biol. Chem.*, 1945, **160**, 397-408.
304. NICOLLE (M.) et ADIL BEY. — *Ann. Inst. Past.*, 1907, **21**, 20.
305. NIEDERL (J. B.) et WEINGARTEN (H.). — *J. Am Chem. Soc.*, 1941, **63**, 3534.

306. ORDAL (E. J.) et BORG (A. F.). — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1942, **50**, 332-336.
307. PALMER (K. J.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1944, **66**, 692.
308. PALMER (K. J.). — *J. Phys. Chem.*, 1944, **48**, 12-21.
309. PALMER (K. J.) et GALVIN (J. A.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1943, **65**, 2187-2190.
310. PANIHEL (J.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1948, **30**, 116.
311. PANIHEL (J.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1948, **30**, 336.
312. PANKHURST (K. G. A.). — *Trans. Faraday Soc.*; Congrès de Bordeaux, 1947: Formation de complexes entre la gélatine et les arylsulfates de sodium.
313. PANKHURST (K. G. A.) et SMITH (R. C. M.). — *Trans. Faraday Soc.*, 1944, **40**, 565-571.
314. PANKHURST (K. G. A.) et SMITH (R. C. M.). — *Trans. Faraday Soc.*, 1945, **41**, 630.
315. PAPPANHEIMER (A. M.). — *J. Exp. Med.*, 1940, **71**, 263.
316. PARPART (A. K.) et DZIEMIAN (A. J.). — *Cold Spring Harbour Symp.*, 1940, **8**, 17.
317. PARTINGTON (J. R.). — *J. Chem. Soc.*, 1911, **99**, 313.
318. PECK (R. L.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1942, **64**, 487-490.
319. PFANKUCH (E.) et KAUSCHE (G. A.). — *Biochem. Z.*, 1942, **312**, 72-77.
320. PIETTRE (M.). — *Biochimie des protéines. Des protéines humorales au protoplasma par la méthode à l'acétone aux basses températures*. Baillière, éd. Paris, 1937.
321. POLONOVSKI (J.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1943, **25**, 44-54.
322. POLONOVSKI (J.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1946, **140**, 19-21.
323. POLONOVSKI (J.) et COTONI (L.). — *Ann. Inst. Past.*, 1947, **73**, 1155.
324. POLONOVSKI (J.) et MACHEBŒUF (M.). — *Ann. Inst. Past.*, 1947, **73**, 980.
325. POLONOVSKI (J.) et MACHEBŒUF (M.). — *Ann. Inst. Past.*, 1948, **74**, 196.
326. POLONOVSKI (J.) et MACHEBŒUF (M.). — *Ann. Inst. Past.*, 1948, **74**, 203.
327. POLONOVSKI (M.), BAUDU (L.) et NEUZIL (E.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1947, **29**, 958-67.
328. POLONOVSKI (M.), NEUZIL (E.), BAUDU (L.) et POLONOVSKI (J.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1947, **141**, 460-462.
329. PONDER (E.). — The mammalian red cell and the properties of hæmolytic systems. 1934. *Protoplasma Monographien*, Berlin, Gebr.-Bornträger.
330. PONDER (E.). — *J. Gen. Physiol.*, 1943, **27**, 1; 483.
331. PONDER (E.). — *J. Gen. Physiol.*, 1946, **30**, 15-23.
332. POWNEY (J.) et ADDISON (C. C.). — *Trans. Faraday Soc.*, 1937, **33**, 1253-1260.
333. PRESTON (W. C.). — *J. Phys. Colloid Chem.*, 1948, **52**, 84.
334. PRICE (D.). — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1946, **46**, 407-426.
335. PRIGGE (R.). — *Klin. Wochschr.*, 1940, **19**, 1273-1276.
336. PUTNAM (F. W.). — *Adv. in Protein Chem.*, 1948, **4**, 78-122.
337. PUTNAM (F. W.) et NEURATH (H.). — *J. Biol. Chem.*, 1943, **150**, 263-264.
338. PUTNAM (F. W.) et NEURATH (H.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1944, **66**, 692 697.

339. PUTNAM (F. W.) et NEURATH (H.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1944, **66**, 1992.
340. PUTNAM (F. W.) et NEURATH (H.). — *J. Biol. Chem.*, 1945, **159**, 195-209.
341. QUISNO (R. A.) et FOTER (M. J.). — *J. Bact.*, 1946, **52**, 111-117.
342. QUISNO (R. A.), GIBBY (I. W.) et FOTER (M. J.). — *Am. J. Pharm.*, 1946, **118**, 320-323.
343. RAHN (O.). — *Milk Plant Monthly*, 1945, [12], **34**, 24-26.
344. RAHN (O.). — *J. Am. Pharm. Assoc.*, 1947.
345. RAHN (O.). — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1946, **62**, 2-4.
346. RAHN (O.) et VAN ESELTINE (W. P.). — *Ann. Rev. Microbiol.*, 1947, **1**, 173-192.
347. RALSTON (A. W.). — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1946, **46**, 351-370.
348. RAMON (G.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1922, **86**, 711.
349. RANSOM (F.). — *Deutsch. med. Wochensch.*, 1901, **27**, 194.
350. RAWLINS (A. L.), SWEET (L. A.) et JOSLYN (D. A.). — *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.*, 1943, **32**, 11-16.
351. RENSHAW (R. R.) et HOTCHKISS (H. T.). — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1926, **48**, 2698.
352. REYCHLER. — *J. Chem. Soc.*, 1913, **104**, abst **1**, 995.
353. RICE (R. G.), BALLOU (G. A.), BOYER (P. D.), LUCK (J. M.) et LUM (F. G.). — *J. Biol. Chem.*, 1945, **158**, 609.
354. RIPERT (J.) et SISLEY (J. P.). — *Corps gras*, 1943, **2**, 41.
355. RIPERT (J.) et SISLEY (J. P.). — *Corps gras*, 1946, **2**, 41.
356. ROBERTS (M. H.) et RAHN (O.). — *J. Bact.*, 1946, **52**, 639-644.
357. ROY (A. C.) et BIWAS (H. K.). — *Indian J. Med. Res.*, 1943, **31**, 225-230.
358. RUEKA (H.). — *Deut. med. Wochsch.*, 1941, **67**, 281.
359. SAIAS (E.). — Contribution à l'étude des associations lipoprotéidiques en couches moléculaires à la surface de solutions aqueuses. *Thèse de Doctorat en Pharmacie*. Paris, 1942.
360. SAIAS (E.). — *C. R. Ac. Sc.*, 1942, **214**, 393.
361. SAIAS (E.). — *J. Chim. Phys.*, 1943, **40**, 113.
362. SCATCHARD (G.), BATCHELDER (A. C.) et BROWN (A.). — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1946, **68**, 2320.
363. SCHADER (E.) in JERCHEL (D.). — *Habilitationsschrift*. Heidelberger, 1945 et *FIAT. Rev. German Sci.*, 1939-1946; *Bioch.*, 1947, **1**, 59-65.
364. SCHMIDT (K. H.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1943, **277**, 117.
365. SCHMIDT (S.). — *Biochem. Z.*, 1932, **256**, 158-189.
366. SCHMIDT (S.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1931, **108**, 536-537.
367. SCHULMAN (J. H.). — *Trans. Faraday Soc.*, 1937, **33**, 1116.
368. SCHULMAN (J. H.). — *Physical and Physicochemical studies of Cells dans Cytology and Cell Physiology*. G. Bourne, Oxford, 1942-1946, 60.
369. SCHULMAN (J. H.) et RIDEAL (E. K.). — *Proc. Roy. Soc. London B*, 1937, **122**, 29-43.
370. SCHULMAN (J. H.) et RIDEAL (E. K.). — *Nature*, 1939, **144**, 100.
371. SCHWERT (G. W.), PUTNAM (F. W.) et BRIGGS (D. R.). — *Arch. Biochem.*, 1944, **4**, 371.
372. SEVAG (M. G.) et ROSS (O. A.). — *J. Bact.*, 1944, **48**, 677-682.

373. SHELTON (R. S.), VON CAMPEN (M. G.) et NISONGER (L. L.). — *J. Am. Chem. Soc. Boston Meeting Amer. Chem. Soc.*, sept. 1939, 11-15.
374. SHELTON (R. S.), VAN CAMPEN (M. G.), TILFORD (C. H.), LANG (H. C.), NISONGER (L.), BANDELIN (F. J.) et RUBENKÖENIG (H. L.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1946, **68**, 753-755.
375. SHELTON (R. S.), VAN CAMPEN (M. G.), TILFORD (C. H.), LANG (H. C.), NISONGER (L.), BANDELIN (F. J.) et RUBENKÖENIG (H. L.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1946, **68**, 755-757.
376. SHELTON (R. S.), VAN CAMPEN (M. G.), TILFORD (C. H.), LANG (H. C.), NISONGER (L.), BANDELIN (F. J.) et RUBENKÖENIG (H. L.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1946, **68**, 757-759.
377. SHEPARD (E. R.) et SHONLE (H. A.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 2269-2270.
378. SHOCH (D.) et FOGELSON (S. J.). — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1942, **50**, 304.
379. SINGER (H. O.). — Thesis 1942. Harvard University in PUTNAM (F. W.). — *Adv. Protein Chem.*, 1948, [79], **4**, 96.
380. SISLEY (J. P.). — *Ind. des Corps Gras*, 1945, **1**, 7.
381. SMITH (E. L.). — *Science*, 1940, **91**, 199.
382. SMITH (E. L.). — *J. Gen. Physiol.*, 1941, **24**, 565 et 583.
383. SMITH (E. L.) et PICKELS (E. G.). — *J. Gen. Physiol.*, 1941, **24**, 753.
384. SMITH (W.). — *J. Path. Bact.*, 1939, **48**, 557-571.
385. SPIRA (G.). — *Communic. personnelle inéd.*
386. SREENIVASAYA (M.) et PIRIE (N. W.). — *Biochem. J.*, 1938, **32**, 1707-1710.
387. STACEY et WEBB. — *Proc. Roy. Soc. B*, 1947, **143**, 532.
388. STEINHARDT (J.). — *J. Biol. Chem.*, 1941, **141**, 295.
389. STEINHARDT (J.) et FUGITT (C. H.). — *J. Research. Natl. Bur. Standards*, 1942, **29**, 315.
390. STOCK (C. C.) et FRANCIS (T.). — *J. Exptl. Med.*, 1940, **71**, 661-681.
391. STOCK (C. C.) et FRANCIS (T.). — *J. Immunol.*, 1943, **47**, 303-308.
392. STOCK (C. C.) et FRANCIS (T.). — *J. Exptl. Med.*, 1943, **77**, 323-336.
393. TASMAN et BRANDWIJK. — *J. Infect. Dis.*, 1939, **65**, 73.
394. TAYEAU (F.). — *Recherches sur la nature, la stabilité et le rôle biologique des liaisons unissant les lipides et les protéides dans le sérum sanguin. Thèse de Doctorat ès Sciences*, Bordeaux, 1939.
395. TAYEAU (F.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **130**, 1027.
396. TAYEAU (F.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **130**, 1029.
397. TAYEAU (F.). — *Le lait*, 1940, **20**, 129.
398. TAYEAU (F.). — *C. R. Ac. Sc.*, 1941, **212**, 575.
399. TAYEAU (F.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1943, **137**, 240.
400. TAYEAU (F.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1943, **137**, 239.
401. TAYEAU (F.). — *Protéides et lipides dans le sérum sanguin. Drouillard*, Bordeaux, 1944.
402. TAYEAU (F.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1944, **138**, 700.
403. TAYEAU (F.) et ROLLAND (R.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1947, **29**, 107-110.
404. TILLEY (F. W.) et SCHAFER (J. M.). — *J. Bact.*, 1928, **16**, 279-285.

405. TOMPSETT (S. L.). — *Biochem. J.*, 1930, **24**, 1148-1163.
406. TURNER (M. E.) et GIBSON (R. B.). — *J. Clin. Invest.*, 1932, **11**, 735.
407. TUSTANOVSKI (A. A.). — *Biokhimiia*, 1947, **12**, 285.
408. VALETTE (G.). — *J. Pharm. Chim.*, 1936, **43**, 408.
409. VALETTE (G.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1937, **19**, 1676.
410. VALETTE (G.) et CAVIER (R.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1938, **20**, 1256.
411. VALKO (E. I.). — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1946, **46**, 451-478.
412. VALKO (E. I.) et DUBOIS (A. S.). — *J. Bact.*, 1944, **47**, 15-25.
413. VALKO (E. I.) et DUBOIS (A. S.). — *J. Bact.*, 1945, **50**, 481-490.
414. VELLUZ (L.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1927, **9**, 483.
415. VELLUZ (L.) et BOUCHARA (E.). — *C. R. Soc. Biol.* 1931, **106**, 1131.
416. VINCENT (H.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1926, **182**, 1307-1310.
417. VIVINO (A. E.) et KOPPANYI (T.). — *J. Am. Pharm.*, A 1946, **35**, 169-173.
418. VOIGT (R.) et WAGNER, JAUREGG (Th.). — *Arb. Staats Inst. exp. Therap.* Georg Speyer Haus, Frankfurt a. M., 1940, **39**, 25.
419. WAINIO (W. W.), COOPERSTEIN (S. J.), KOLLEN (S.) et EICHEL (B.). — *J. Biol. Chem.*, 1948, **173**, 145-152.
420. WALLENFELS (K.). — *Oesterr. Chem. Ztg.*, 1940, **19-20**, 8.
421. WALCH (H.) et BREWER (C. M.). — *J. Immunol.*, 1942, **43**, 25-30.
422. WESTPHAL (O.). — *Ber. chem. Ges.*, 1941, **74 B**, 1365-1372.
423. WESTPHAL (O.) et JERCHER (D.). — *Kolloid Z.*, 1942, **101**, 213-220.
424. WHITE (C. P.). — *The Med. chronicle*, 1907-1908, **14**, 403.
425. WHITE (C. P.). — *J. Physiol.*, 1908, **38**, vi.
426. WILBRANDT (W.). — *Arch. Ges. Physiol. (Pflügers)*, 1941, **245**, 22-52.
427. WILBRANDT (W.). — *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta*, 1943, **1**, C 80, C 81.
428. WINKLER (K. C.). — *Thesis Leiden*, 1938.
429. WOHLGEMUTH (J.). — *Biochem. Z.*, 1909, **21**, 417.
430. WOLFF (E. H.) et FRANKENTHAL (K.). — *Krankheitforsch.*, 1925, **1**, 445.
431. WOODRUFF (E. H.), ASPERGREN (B. D.) et MANTELE (F.). — 104th. Meeting, Am. Chem. Soc. Buffalo N. Y., 7-11 sept. 1942.
432. WRIGHT (K. A.), ABBOTT (A. D.), SIVERTZ (V.) et TARTAR (H. V.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1939, **61**, 549-554.
433. WUNDERLY (C.). — *Helv. chem. Acta*, 1942, **25**, 498.
434. YOUNG (C. B. F.) et COONS (K. W.). — *Surface active agents*. Chemical. Pub. Co Brooklyn, N. Y., 1945.
435. ZELDIS (L. J.), ALLING (E. L.), McCOORD (A. B.) et KULKA (J. P.). — *J. Exp. Med.*, 1945, **82**, 411-430.

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
INTRODUCTION.	1
I. — <i>Action des savons à cation actif sur les protéines.</i>	5
1. — Précipitation de la sérum-albumine par les savons cationiques	7
1° Précipitation de la sérum-albumine en fonction de la quantité de zéphirol.	7
2° Précipitation en fonction du pH.	8
3° Influence de la dilution	8
4° Influence des ions minéraux	9
5° Influence de la nature du savon cationique	11
6° Interprétation des résultats	12
2. — Précipitation des protéines du sérum par les savons cationiques	15
1° Précipitation du sérum total	15
a) Précipitation en fonction de la teneur en zéphirol et du pH	15
b) Influence des sels minéraux.	18
c) Influence de la nature du saponium	19
d) Précipitation du milieu dilué	20
2° Précipitation des globulines γ	21
3° Interprétation des résultats. Comportement du sérum sanguin	23
3. — Propriétés des complexes protéines-saponiums	26
1° Solubilité des cénapses protéines-saponiums	26
2° Stabilité des cénapses protéines-saponiums	27
3° Influence du saponium sur le pH de la solution de protéine	27
4° Tension superficielle des mélanges protéines-saponiums.	29
5° Electrophorèse	32
6° Pouvoir rotatoire	33
7° Viscosité et pression osmotique	34
Conclusions	34

	Pages
II. — <i>Action des savons à cation actif sur les lipides</i>	37
1 ^o Glycérides et stérides	38
2 ^o Cholestérol	38
3 ^o Lécithine	39
4 ^o Cérébrosides	42
Conclusions	43
III. — <i>Action des savons à cation actif sur les cénapses lipido-pro-</i> <i>téiques.</i>	43
1. — <i>Extraction des lipides par l'éther en fonction de savons</i> <i>cationiques.</i>	44
1 ^o <i>Extraction des lipides en fonction de la concentration</i> <i>en zéphirol</i>	44
2 ^o <i>Influence du pH sur l'extraction des lipides en présence</i> <i>de zéphirol</i>	46
3 ^o <i>Influence du temps de contact</i>	46
4 ^o <i>Influence de l'addition d'alcool sur la délipidation en</i> <i>présence de zéphirol.</i>	48
5 ^o <i>Influence de la nature du savon cationique</i>	48
2. — <i>Sort des lipides dans la précipitation des protéides du</i> <i>sérum par les savons cationiques.</i>	50
1 ^o <i>Précipitation des protéides du sérum de pH à pH</i> <i>constant en fonction de la quantité de zéphirol</i>	50
2 ^o <i>Précipitation des protéides du sérum en fonction du pH.</i>	51
3 ^o <i>Entraînement des lipides dans la précipitation de pro-</i> <i>téines</i>	53
3. — <i>Discussion. Interprétation.</i>	54
1 ^o <i>Délipidation en présence d'éther.</i>	54
2 ^o <i>Répartition des lipides dans la précipitation des pro-</i> <i>téines</i>	55
A. <i>Lipides extractibles et lipides précipitables</i>	56
B. <i>Liaison lipides-protéines et décollement des lipides.</i>	56
C. <i>Lipides précipitables et lipides non précipitables</i>	59
3 ^o <i>Discussion et conclusion</i>	61
4. — <i>Applications de l'action des saponiums sur les cénapses</i> <i>à des problèmes biochimiques</i>	62
1 ^o <i>Délipidation du sérum sanguin</i>	62
2 ^o <i>Préparation de fractions riches en lipides.</i>	64

	Pages
IV. — <i>Action des savons à cation actif sur les cénapses in vivo.</i>	
<i>Action sur la cellule</i>	65
1° <i>Action sur la membrane cellulaire. Lyse</i>	66
Hémolyse par les saponiums	66
Inhibiteurs de l'hémolyse	68
Mécanisme de l'hémolyse par les saponiums	70
Action sur la membrane cellulaire.	72
Mécanisme de la cytolyse	73
2° <i>Action des saponiums sur les enzymes.</i>	75
1. — Xanthine déhydrase	75
2. — Laccase	76
3. — Catécholoxydase.	77
4. — Acide ascorbique-oxydase.	79
5. — Cytochrome-oxydase	79
6. — Hydrolases	80
Conclusion	81
CONCLUSIONS	82
BIBLIOGRAPHIE	85

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ :

Les méthodes d'analyse par chromatographie
et par partage entre deux solvants à contre-courant.

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 3 mai 1949.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

A. CHATELET.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

JEAN SARRAILH.

